

**Exposition von Säuglingen gegenüber estergebundenem  
2- und 3-Monochlorpropandiol und Glycidol –  
Analysenmethoden und aktuelle Gehalte  
in Humanmilch und Säuglingsmilchnahrung**

**Dissertation**

**zur Erlangung des akademischen Grades**

**„doctor rerum naturalium“ (Dr. rer. nat.)**

**vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Dipl. troph. Friederike Wöhrlin**

**geboren am 15.08.1982 in Freiburg im Breisgau**

**1. Gutachter PD Dr. Volker Böhm**

Friedrich-Schiller-Universität Jena  
Institut für Ernährungswissenschaften  
Arbeitsgruppe Bioaktive Pflanzenstoffe  
Dornburger Str. 25  
07743 Jena

**2. Gutachter Prof. Dr. Gerhard Jahreis**

Friedrich-Schiller-Universität Jena  
Institut für Ernährungswissenschaften  
Lehrstuhl Ernährungsphysiologie  
Dornburger Str. 24  
07743 Jena

**3. Gutachter Prof. Dr. Michael Petz**

Bergische Universität Wuppertal  
Fachbereich C: Mathematik und Naturwissenschaften  
Abteilung für Lebensmittelchemie  
Gaußstr. 20  
42119 Wuppertal

eingereicht: 21.06.2013

Datum der Promotion: 04.11.2013

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von März 2010 bis Juni 2013 in der Fachgruppe „Kontaminanten“ im Bundesinstitut für Risikobewertung in Berlin angefertigt.

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>VERZEICHNIS DER TABELLEN.....</b>	<b>V</b>
<b>VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN.....</b>	<b>VII</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>IX</b>
<b>1 EINLEITUNG UND ZIELSTELLUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2 WISSENSSTAND .....</b>	<b>4</b>
<b>2.1 MCPD- und Glycidylfettsäureester .....</b>	<b>4</b>
<b>2.2 Gehalte in Lebensmitteln und Exposition.....</b>	<b>6</b>
<b>2.3 Gefährdungspotential und Risikocharakterisierung.....</b>	<b>9</b>
2.3.1 3-MCPD .....	9
2.3.2 Glycidol.....	10
2.3.3 2-MCPD .....	12
<b>2.4 Analytik von gebundenem MCPD und Glycidol .....</b>	<b>12</b>
2.4.1 Indirekte Methoden .....	12
2.4.2 Direkte Bestimmung .....	14
<b>2.5 Bildung von hitzebedingten Kontaminanten in Speiseölen und Reduzierungsstrategien .....</b>	<b>16</b>
<b>2.6 Industriell hergestellte Säuglingsmilchnahrung .....</b>	<b>17</b>
<b>3 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>19</b>
<b>3.1 Indirekte Messung von gebundenem Glycidol und MCPD.....</b>	<b>19</b>
3.1.1 BfR-Methode 9 .....	19
3.1.2 DGF-Einheitsmethode C-VI 18 (10).....	19
<b>3.2 Direkte Messung von GE mittels GC-MS und GC-MS/MS .....</b>	<b>21</b>
<b>3.3 Direkte Messung von GE mittels LC-MS .....</b>	<b>22</b>
<b>3.4 Proben zur Untersuchung von Humanmilch.....</b>	<b>23</b>
3.4.1 Gewinnung der Probandinnen und Fallzahlabschätzung .....	23
3.4.2 Sammlung und Lagerung der Proben .....	24
3.4.3 Erhebungsinstrument Fragebogen .....	24
3.4.4 Beschreibung der Milchproben .....	24

---

<b>3.5</b>	<b>Analytik Milchproben .....</b>	<b>25</b>
3.5.1	Milchfettextraktion .....	25
3.5.2	Aufarbeitung des Fettextrakts .....	26
3.5.3	GC-MS-Messung der flüssigen Milchproben .....	28
<b>3.6</b>	<b>Proben zur Untersuchung von Säuglingsmilchnahrung.....</b>	<b>28</b>
<b>3.7</b>	<b>Analytik Säuglingsmilchnahrung .....</b>	<b>29</b>
3.7.1	Fettextraktion mittels beschleunigter Lösemittlextraktion....	29
3.7.2	Aufarbeitung des Fettextrakts .....	30
3.7.3	GC-MS-Messung Säuglingsmilch.....	33
<b>3.8</b>	<b>Berechnung zum Vergleich von direkten und indirekten Analysenmethoden.....</b>	<b>33</b>
<b>3.9</b>	<b>Statistische Berechnungen .....</b>	<b>33</b>
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>34</b>
<b>4.1</b>	<b>Methodenvergleich zur Bestimmung von GE.....</b>	<b>34</b>
4.1.1	Voruntersuchungen zum indirekten Nachweis .....	34
4.1.2	Untersuchungen zum direkten Nachweis .....	36
<b>4.2</b>	<b>Methodenentwicklung zur Bestimmung von 3-MCPD- und 2- MCPD-Fettsäureestern in Human- und Ziegenmilch .....</b>	<b>43</b>
4.2.1	Vergleich verschiedener Fettextraktionsmethoden .....	43
4.2.2	Extraktaufreinigung .....	45
4.2.3	Untersuchungen zur geeigneten Kalibrierung .....	45
4.2.4	Untersuchungen zum Einfluss der Fettextraktion .....	46
4.2.5	Ermittlung der Extraktionsausbeute des Analyten .....	47
<b>4.3</b>	<b>Untersuchungsergebnisse der Humanmilchproben und Auswertung des Ernährungsfragebogens.....</b>	<b>48</b>
<b>4.4</b>	<b>Untersuchungsergebnisse der Ziegenmilchproben .....</b>	<b>50</b>
<b>4.5</b>	<b>Entwicklung einer Methode zur indirekten Bestimmung von gebundenem 3-MCPD, 2-MCPD und Glycidol in Säuglingsmilchnahrung.....</b>	<b>50</b>
4.5.1	Untersuchungen zur Esterhydrolyse .....	51
4.5.2	Entwicklung einer Methode zur Extraktion von Fett aus Säuglingsmilchnahrung .....	53
4.5.3	Einfluss der Fettextraktion auf das Analysenergebnis .....	53
4.5.4	Untersuchungen zur geeigneten Kalibrierung .....	54
<b>4.6</b>	<b>Untersuchung zur Belastung von Säuglingsmilchnahrung .....</b>	<b>55</b>
4.6.1	Vergleich Pre- und 1-Nahrung .....	57
4.6.2	Vergleich der Handelsmarken.....	57
4.6.3	Korrelation der Analyten.....	58
4.6.4	Vergleich der Fettgehalte.....	58

---

<b>4.7 Vergleich der direkten und indirekten Bestimmungsmethode</b>	<b>60</b>
<b>5 DISKUSSION</b>	<b>65</b>
<b>5.1 Voruntersuchungen: Methodenvergleich zur Bestimmung von Glycidylfettsäureestern</b>	<b>65</b>
5.1.1 Indirekter Nachweis (TF)	65
5.1.2 Direkter Nachweis	67
<b>5.2 Methodenentwicklung zur Bestimmung von 3-MCPD- und 2-MCPD-Fettsäureestern in Human- und Ziegenmilch</b>	<b>74</b>
5.2.1 Vergleich verschiedener Fettextraktionsmethoden	74
5.2.2 Einfluss der Fettextraktion auf das Analysenergebnis	75
5.2.3 Extraktaufreinigung und Kalibrierung	75
5.2.4 Empfindlichkeit und Methodvalidierung	76
<b>5.3 Methodenentwicklung Säuglingsmilchnahrung</b>	<b>77</b>
5.3.1 Untersuchungen zur Esterhydrolyse	77
5.3.2 Fettextraktion und Kalibrierung	79
5.3.3 Empfindlichkeit und Methodvalidierung	80
<b>5.4 Vergleich der direkten und indirekten Methoden</b>	<b>80</b>
<b>5.5 Ergebnisse der Untersuchung von Human- und Ziegenmilch</b>	<b>83</b>
<b>5.6 Gehalte in Säuglingsmilchnahrung und Schätzung der Exposition von Säuglingen</b>	<b>85</b>
5.6.1 Fettgehalt der Proben.	85
5.6.2 Gebundenes 3-MCPD	86
5.6.3 Gebundenes 2-MCPD	87
5.6.4 Gebundenes Glycidol	88
<b>SCHLUSSFOLGERUNGEN</b>	<b>90</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>92</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>94</b>
<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>96</b>
<b>LEBENS LAUF</b>	<b>102</b>
<b>PUBLIKATIONS LISTE</b>	<b>103</b>
<b>EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG</b>	<b>104</b>

<b>6 ANHANG .....</b>	<b>A1</b>
<b>6.1 Berechnung zur Fallzahlaberschätzung .....</b>	<b>A1</b>
<b>6.2 Untersuchte Humanmilchproben .....</b>	<b>A2</b>
<b>6.3 Ernährungsfragebogen .....</b>	<b>A4</b>
<b>6.4 Auswertung des Ernährungsfragebogens .....</b>	<b>A6</b>
<b>6.5 Einzeldaten der untersuchten Ziegenmilchproben .....</b>	<b>A8</b>
<b>6.6 Verzeichnis der verwendeten Geräte, Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und Standardsubstanzen .....</b>	<b>A9</b>
6.6.1 Allgemeine Laborgeräte .....	A9
6.6.2 Verzeichnis der verwendeten Lösungen und Chemikalien ....	A10
6.6.3 Verbrauchsmaterial.....	A11
6.6.4 Verzeichnis der verwendeten Standardsubstanzen .....	A11
6.6.5 Messinstrumente .....	A12
<b>6.7 Methodenparameter .....</b>	<b>A13</b>
6.7.1 LC-APCI-MS-Methode für die direkte Messung von Glycidylestern (Methode C).....	A13
6.7.2 Geräteparameter der direkten Bestimmung von Glycidylestern mittels GC-MS/MS .....	A15
6.7.3 Geräteparameter für die Bestimmung von MCPD-Estern in Milch mittels GC-MS.....	A16
6.7.4 Bestimmung von gebundenem Glycidol und MCPD in Säuglingsmilchnahrung mittels GC-MS .....	A17
<b>6.8 Validierung und Qualitätssicherung.....</b>	<b>A20</b>
6.8.1 Validierung der Methode zur Untersuchung von Säuglingsmilch (Methode B) .....	A21
6.8.2 Validierung Untersuchungsmethode von Humanmilch.....	A27
6.8.3 Validierung der Methode zur direkten Bestimmung von Glycidylestern .....	A31

## Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1	Konzentrationsstufen der Kalibrierreihe der Methode für Humanmilch .....	27
Tabelle 2	Hersteller und Preise der untersuchten Säuglingsmilchnahrungen .....	28
Tabelle 3	Methodenparameter für die beschleunigte Lösemittlextraktion von Säuglingsmilchnahrung.....	30
Tabelle 4	Konzentrationsstufen der Kalibrierreihe Methode für Säuglingsmilch .....	32
Tabelle 5	Vergleich von Analysenergebnissen von zwei Proben bei Anwendung unterschiedlicher TF zur Quantifizierung des Glycidols.....	36
Tabelle 6	Ermittlung der Wiederfindungsraten mit und ohne IS .....	37
Tabelle 7	Ausgewählte Übergänge, Retentionszeiten und optimierte Kollisionsenergien für 9 Glycidylfettsäureeste .....	41
Tabelle 8	Dotierung von Humanmilch vor und nach der Extraktion. Wiederfindungsraten und Ergebnisse der einfaktoriellen Varianzanalyse...	46
Tabelle 9	Ermittlung der Extraktionsausbeute der Analyten .....	47
Tabelle 10	Vergleich der Analysenergebnisse nach saurer bzw. alkalisch katalysierter Esterhydrolyse. ....	51
Tabelle 11	Wiederfindungsraten bei Dotierung von Säuglingsanfangsnahrung vor und nach der ASE sowie Ergebnisse der einfaktoriellen Varianzanalyse ....	54
Tabelle 12	Vergleich von Mittelwert $\pm$ SD und Medianwert für Glycidol, 2-MCPD und 3-MCPD in Pre- und 1-Nahrung .....	57
Tabelle 13	Mittelwert $\pm$ SD, getrennt nach Handelsmarken (Pre- und 1-Nahrung zusammen, jeweils n=10) .....	57
Tabelle 14	Direkte Bestimmung von Glycidylfettsäureestern in Säuglingsmilchnahrung. Vergleich der indirekten und direkten Bestimmung .....	63
Tabelle 15	Direkte Bestimmung von Glycidylfettsäureestern in Speisefetten und -ölen. Vergleich der direkten und indirekten Bestimmung .....	64
Tabelle 16	Berechnung der Mindestanzahl an Proben zur Untersuchung der Belastung von Humanmilch .....	A1
Tabelle 17	Daten der untersuchten Humanmilchproben und Ergebnisse der Fettgehaltsbestimmung.. ....	A2
Tabelle 18	Daten der untersuchten Ziegenmilchproben und Ergebnisse der Fettgehaltsbestimmung. ....	A8



---

Tabelle 19	Selected Ion Monitoring (SIM) für die protonierten Molekülionen und zugehörige Einstellungen des Declustering Potential (DP), Retentionszeit (RT) und Dwell time der Methode C. ....	A14
Tabelle 20	Präzision der Methode B–Variationskoeffizienten innerhalb eines Tages ..	A22
Tabelle 21	Wiederfindungsraten bei Dotierung von Säuglingsanfangsnahrung .....	A23
Tabelle 22	Lineare und quadratische Kalibrierfunktionen für Säuglingsmilch.....	A24
Tabelle 23	Linearität des Arbeitsbereiches der Methode B.....	A25
Tabelle 24	Übersicht über NG, EG und BG in Milchfett und in Milchpulver, ermittelt nach der Leerwertmethode nach DIN 32 645 in Methode B .....	A27
Tabelle 25	Ermittlung von Präzision und Wiederfindung in Milch (Methode A) .....	A28
Tabelle 26	Lineare und quadratische Kalibrierfunktionen für Milch (Methode A) .....	A29
Tabelle 27	Linearität des Arbeitsbereiches der Methode für Milch (Methode A) .....	A29
Tabelle 28	Kenndaten sowie Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Matrixkalibrierfunktionen nach DIN ISO 32645 für Methode A.....	A30
Tabelle 29	Abschätzung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen bei der direkten Bestimmung von 7 Glycidylfettsäureestern über das Signal zu Rausch Verhältnis nach Standardinjektion (Methode C).....	A31

## Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1	Strukturformeln 3-MCPD, 2-MCPD und Glycidol sowie deren Ester.....	5
Abbildung 2	Fettsäurespektrum verschiedener Speiseöle .....	6
Abbildung 3	Indirekte Bestimmung von estergebundenem 3-MCPD, 2-MCPD und Glycidol nach Umwandlung der GE in 3-MBPD Ester.....	14
Abbildung 4	Prinzip der DGF-Einheitmethode C-VI 18 (10) .....	20
Abbildung 5	Modell eines Triple Quadrupol Massenspektrometers.....	22
Abbildung 6	Schematische Darstellung der Aufarbeitung des Fettextrakts aus Milch ....	26
Abbildung 7	Schematische Darstellung der Aufarbeitung des Fetteextrakts aus Säuglingsmilchnahrung.....	31
Abbildung 8	Umwandlung des Zwischenprodukts Glycidol in 3-MCPD bei Verwendung von Glycidyl-Stearat.....	35
Abbildung 9	Interferenzen bei der Chromatografie von Glycidyl-Oleat in einer Ölprob..	36
Abbildung 10	EI-GC-MS/MS Full-Scan-Spektrum von Glycidyl-Oleat) .....	39
Abbildung 11	MRM-Chromatogram von 8 Glycidylestern mittels GC-MS/MS . .....	40
Abbildung 12	Isolute Multimode Material der verwendeten SPE Kartuschen zur Matrixabreicherung .....	45
Abbildung 13	Chromatogramm der aufgenommenen Fragmentationen der Methode A einer Humanmilchprobe.....	48
Abbildung 14	Angaben zur Häufigkeit des Verzehrs von Streichfetten.....	49
Abbildung 15a-c	Gehalt an gebundenem 3-MCPD, 2-MCPD und Glycidol in verschiedenen Säuglingsmilchnahrungen .....	56
Abbildung 16a-c	Streudiagramme der Gehalte an gebundenem 3-MCPD, 2-MCPD und Glycidol in 70 Säuglingsmilchnahrungen. ....	59
Abbildung 17	Vergleich der Chromatogramme einer Säuglingsmilchnahrung mit Standardlösung.. .....	60
Abbildung 18	Vergleich der direkten und indirekten Bestimmung bei der Analyse von 18 Säuglingsmilchnahrungen. ....	62
Abbildung 19	Vergleich der direkten und indirekten Bestimmung bei der Analyse von 7 Speisefetten und -ölen (Ringversuchsproben). ....	62
Abbildung 20	Angaben zur Häufigkeit des Verzehrs von Lebensmitteln, in denen 3-MCPD-Ester nachgewiesen wurden .....	A6

Abbildung 21 Angaben zur Häufigkeit der Verwendung verschiedener Speiseöle im Haushalt.....	A6
Abbildung 22 Angaben wie oft außer Haus gegessen bzw. zuhause gekocht wurde.....	A7
Abbildung 23 Angaben zur Häufigkeit des Verzehrs von Brotaufstrichen und Süßigkeiten, in denen 3-MCPD-Ester nachgewiesen wurden.....	A7
Abbildung 24 ausgewählte Fragmentationen der GC-MS-SIM-Methoden für Human- und Säuglingsmilchnahrung.....	A18
Abbildung 25 Ergebnisse der Qualitätskontrollprobe über den Analysenzeitraum mit Methode B . ....	A21
Abbildung 26 Ergebnisse der Qualitätskontrollprobe über den Analysenzeitraum mit Methode A. ....	A28

## Abkürzungsverzeichnis

2-MBPD	2-Monobrompropandiol
3-MBPD	3-Monobrompropandiol
2-MCPD	2-Monochlorpropandiol
3-MCPD	3-Monochlorpropandiol
abs.	absolut
AOCS	American Oil Chemists' Society (Amerikanischen Öl-Chemiker-Gesellschaft)
ASE	Accelerated Solvent Extraction (Beschleunigte Lösemittlextraktion)
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization (Chemische Ionisation bei Atmosphärendruck)
BG	Bestimmungsgrenze
DiätV	Diätverordnung
EG	Erfassungsgrenze
GC-MS	Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
GE	Glycidylfettsäureester
GPC	Gelpermeationschromatografie
EI	Elektronenstoßionisation
ESI	Electrosprayionisation
IARC	International Agency for Research on Cancer (Internationale Agentur für Krebsforschung)
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
KG	Körpergewicht
LC-MS/MS	Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (Flüssigkeitschromatografie gekoppelt mit Tandemmassenspektrometrie)
LC-ToF-MS	Liquid Chromatography-Time of Flight-Mass Spectrometry (Flüssigkeitschromatografie gekoppelt mit Flugzeitmassenspektrometrie)
LOD	Limit of Detection (= BG)
LOQ	Limit of Quantification (= NG)
MoE	Margin of Exposure
NG	Nachweisgrenze
MS	Massenspektrometer
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (Kernspinresonanz)
PBA	Phenyl Boronic Acid (Phenylboronsäure)
RSD	Relative Standardabweichung

RT	Retention Time (Retentionszeit)
SIM	Single Ionen Monitoring
SPE	Solid Phase Extraction (Festphasenextraktion)
t-BME	tert-Butylmethylether
TDI	Tolerable Daily Intake (tolerierbare tägliche Aufnahmedosis)
WFR	Wiederfindungsrate

# 1 Einleitung und Zielstellung

Ernährung ist in keinem anderen Lebensabschnitt so wichtig wie im Säuglings- und frühen Kindesalter (Koletzko 2012). Das rasche Wachstum mit der dynamischen Entwicklung und Differenzierung der kindlichen Gewebe fordert höchste Ansprüche in Bezug auf die qualitative Zusammensetzung der Nahrung. Stillen gilt in den ersten Lebensmonaten als beste Form der Ernährung des Säuglings. Ist Stillen nicht möglich, muss auf industriell gefertigte Säuglingsmilchnahrung zurückgegriffen werden, an die besonders hohe Anforderungen zu stellen sind. Durch die auf ein einziges Lebensmittel beschränkte Ernährung sowie die körpergewichtsbezogen hohe Nahrungsaufnahme ist eine Kontamination von Humanmilch bzw. industriell hergestellter Säuglingsmilchnahrung mit unerwünschten Substanzen aus gesundheitlicher Sichtweise besonders problematisch. Hierbei ist auch zu bedenken, dass Säuglinge – abhängig von der jeweiligen Substanz – möglicherweise besonders empfindlich für toxische Effekte sind.

Untersuchungen der Lebensmittelüberwachung in Baden-Württemberg zeigten Ende 2007, dass raffinierte Pflanzenöle und -fette 3-Monochlorpropandiol-Fettsäureester (3-MCPD-Fettsäureester) im einstelligen mg/kg-Bereich enthalten; nicht-raffinierte Speisefette und -öle waren nicht belastet (Weißhaar 2008). Da raffinierte Fette bei der Herstellung von Säuglingsanfangs- und Folgemilch Verwendung finden, fand sich auch darin eine entsprechende Belastung (BfR 2007). Unter der Annahme, dass während des Verdauungsprozesses 3-MCPD aus 3-MCPD-Fettsäureestern vollständig freigesetzt und im Körper bioverfügbar wird, errechnete sich für nicht-gestillte Säuglinge eine deutliche Überschreitung (3- bis 20-fach) der tolerierbaren täglichen Aufnahmedosis (TDI-Wert) von 2 Mikrogramm 3-MCPD je kg KG. 3-MCPD gehört wie beispielsweise Acrylamid zu den unerwünschten Substanzen, die bei der Erhitzung von Lebensmitteln entstehen können; sie führt im Tierversuch bei Ratten u. a. zu einer Hyperplasie der Nierentubuli und in höherer Dosierung zu gutartigen Tumoren. 3-MCPD ist von der Internationalen Agentur für Krebsforschung (IARC) als „possibly carcinogenic to humans“ (Kategorie 2B) eingestuft (BfR 2007).

Da es sich bei 3-MCPD-Fettsäureestern um Prozesskontaminanten handelt, die während der Fettraffination entstehen, überraschten die Untersuchungsergebnisse einer tschechischen Forschergruppe, die in 10 von 12 Humanmilchproben Gehalte von gebundenem 3-MCPD von 0,471 bis 2,195 mg/kg Fett detektierten; in zwei Proben lagen die Werte unterhalb der Nachweisgrenze von 0,3 mg/kg Fett (Zelinková *et al.* 2008). Diese Ergebnisse wurden bisher nicht von anderen Forschungsgruppen bestätigt. Allerdings wurde bereits 1984 in den USA das Vorkommen von 3-MCPD-Fettsäureestern in Ziegenmilch nachgewiesen (Cerbulis *et al.* 1984). Da die vollständige Neu-Synthese dieser Verbindungen im Körper

schwer vorstellbar ist, wurde die Hypothese aufgestellt, dass die lipophilen 3-MCPD-Fettsäureester, ähnlich wie persistente Organochlorverbindungen, nach Aufnahme über die Nahrung im Körper des Menschen gespeichert werden. Eine stillende Mutter würde die Verbindungen dann aus ihrem Fettgewebe freisetzen und in die Milch abgeben (Zelinková *et al.* 2008).

Das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) wurde 2007 beauftragt, eine Analysenmethode zur Bestimmung von 3-MCPD-Fettsäureestern zu validieren. Bei dem Ringversuch stellte sich heraus, dass in einigen Proben mit Methoden, bei denen Natriumchlorid verwendet wurde, 3-MCPD während der Analyse gebildet wird und somit überhöhte Gehalte gemessen wurden (Weißhaar und Perz 2010; Wöhrlin *et al.* 2011). Weitere Untersuchungen ergaben als Ursache, dass raffinierte Speiseöle neben 3-MCPD-Fettsäureestern auch Glycidyl-Fettsäureester (GE) enthalten, die bei der basisch katalysierten Esterhydrolyse in Anwesenheit von Chlorid-Ionen zu 3-MCPD umgesetzt werden (Weißhaar und Perz 2010). Die Konzentrationen von gebundenem Glycidol liegen in der gleichen Größenordnung wie die von gebundenem 3-MCPD. Zusätzlich wurden in raffinierten Speiseölen 2-MCPD-Fettsäureester nachgewiesen, deren Quantifizierung bis vor kurzem mangels Referenzsubstanzen noch nicht möglich war (Kuhlmann 2011a).

Glycidol ist ein gentoxisches Epoxid mit eindeutiger Evidenz für die Kanzerogenität nach oraler Exposition im Tierversuch; es ist von der IARC als „probably carcinogenic to humans“ (Kategorie 2A) eingestuft. Wie bei gebundenem 3-MCPD haben nicht-gestillte Säuglinge in den ersten Lebensmonaten die höchste Exposition; eine erste Einschätzung des BfR ergab für einen Glycidol-Gehalt von 1 mg/kg Fett einen „Margin of Exposure“ (MoE) von 670 (BfR 2009). In diesem Bewertungskonzept für gentoxische Kanzerogene, für die kein Schwellenwert angenommen werden kann, sollte ein MoE-Wert oberhalb von 10000 liegen, damit die Exposition als „low concern“ eingeschätzt werden kann (EFSA 2005). Aktuelle Studien an Ratten zeigen, dass die bisherige Annahme der Risikobewertung, dass 3-MCPD und Glycidol während der Verdauung aus den Estern freigesetzt werden, gerechtfertigt sind (Abraham *et al.* 2013; Appel *et al.* 2013). Zu 2-MCPD liegen bislang keine toxikologischen Daten vor, die eine Risikobewertung erlauben würden.

Seit Bekanntwerden des Vorkommens dieser Verbindungen in raffinierten Fetten wird weltweit an validen direkten und indirekten Analysenmethoden gearbeitet. Diese Aufgabe hat sich als sehr komplex herausgestellt; bereits kleine Abweichungen in der Methodik können sich auf die Ergebnisse auswirken (Crews *et al.* 2012).

Ausgehend von den hohen Anforderungen an analytische Methoden zur Quantifizierung von gebundenem 3-MCPD, 2-MCPD und Glycidol ist es Ziel dieser Arbeit, folgende Fragestellungen zu beantworten:

- Mit welchen Methoden kann gebundenes Glycidol in Lebensmitteln, unter Berücksichtigung der möglichen Umwandlung von Glycidol in 3-MCPD und 2-MCPD, identifiziert und zuverlässig quantifiziert werden?
- Ist die direkte Bestimmung von gebundenem Glycidol einer indirekten Bestimmung vorzuziehen?
- Wie hoch ist die aktuelle Belastung von Humanmilch mit gebundenem 3- und 2-MCPD in Deutschland?
- Vor dem Hintergrund erster Reduzierungserfolge seitens der Industrie: Wie hoch ist die aktuelle Exposition von nicht-gestillten Säuglingen bezüglich gebundenem 3-MCPD, 2-MCPD und Glycidol?
- Lassen sich in Ziegenmilch gebundenes 3-MCPD und/oder 2-MCPD nachweisen?



## 2 Wissensstand

### 2.1 MCPD- und Glycidylfettsäureester

Monochlorpropandiol (MCPD) gehört zur chemischen Gruppe der Chlorpropanole, dabei ist eine Hydroxygruppe des Glycerin-Grundgerüsts an Position 1 oder 2 durch ein Chloratom ersetzt. MCPD-Fettsäureester bestehen aus MCPD, das mit einer oder zwei Fettsäuren verestert ist; es sind somit Mono- und Diester möglich. Bei 3-MCPD-Fettsäureestern befindet sich das Chloratom an Position 3, bei 2-MCPD-Fettsäureestern an Position 2. Wird im Folgenden von „gebundenem MCPD“ gesprochen, so bezieht sich dies auf MCPD aus MCPD-Fettsäureestern (im Gegensatz zu freiem MCPD). Wird von „MCPD“ gesprochen, so bezieht sich dies im Folgenden auf 2- und 3-MCPD.

Glycidol (2,3-Epoxi-1-propanol) hat dasselbe Glycerin-Grundgerüst wie 3-MCPD, jedoch besitzt es eine Epoxidstruktur. GE sind Verbindungen aus Glycidol, das mit einer Fettsäure verestert ist (nur Monoester möglich). Wird im Folgenden von „gebundenem Glycidol“ gesprochen, so bezieht sich dies auf Glycidol aus GE (im Gegensatz zu freiem Glycidol). In Abbildung 1 sind die chemischen Strukturen der Verbindungen dargestellt. Entsprechend dem Fettsäurespektrum von Speisefetten und -ölen (siehe Abbildung 2) ist eine Vielzahl an möglichen MCPD- und Glycidyl-Fettsäureestern denkbar. Bei MCPD-Fettsäureestern ist die Anzahl möglicher Analyten wesentlich höher als bei Glycidyl-Fettsäureestern, die nur als Monoester vorkommen können. Für beide Gruppen von Fettsäureestern konnte gezeigt werden, dass die relative Häufigkeit der einzelnen Ester dem Fettsäurespektrum der jeweiligen Ölsorten entspricht (Dubois *et al.* 2012). Basierend auf dem Fettsäurespektrum der am meisten verwendeten Speisefette und -öle gibt es Überlegungen, dass deren Belastung mit GE quantitativ ausreichend durch die Analyse der sieben häufigsten GE ermittelt werden kann. Diese sind Glycidyl-Laurat, -Myristat, -Palmitat, -Stearat, -Oleat, -Linoleat und -Linolenat (Dubois 2011).

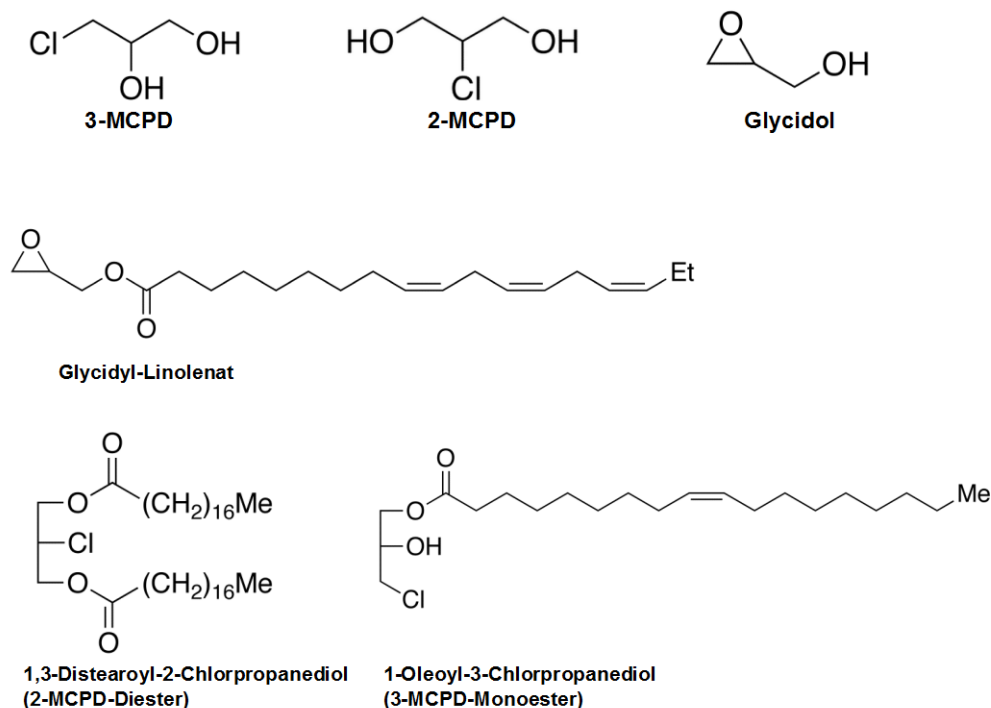


Abbildung 1 Strukturformeln 3-MCPD, 2-MCPD und Glycidol sowie deren Ester (Beispiele)

Das Lebensmittelchemische Institut des Bundesverbandes der Deutschen Süßwarenindustrie veröffentlichte eine Abschätzung für die Berechnung der Anzahl möglicher 3-MCPD-Ester, die in Speiseölen abhängig von der Anzahl der Fettsäuren enthalten sein können (LCI 2008). Der Annahme ist zugrunde gelegt, dass 3-MCPD-Monoester und -Diester vorkommen können und jeweils mehrere stereoisomere Formen möglich sind. Sieben verschiedene Fettsäuren würden dieser Rechnung zufolge theoretisch allein 126 verschiedene 3-MCPD-Ester ergeben. In der Routine ist eine Analyse aller möglichen MCPD-Ester unrealistisch, es sollte deshalb als Kompromiss eine Vereinbarung getroffen werden, welche Analyten eingeschlossen werden (Crews *et al.* 2012).

Bei der Untersuchung von 29 Palmfett-Proben mit direkten und indirekten Methoden zeigte sich, dass  $89 \pm 8$  % der MCPD-Ester als Diester vorlagen. Von den MCPD-Estern waren  $35 \pm 5$  % 2-MCPD-Ester (Dubois *et al.* 2012).

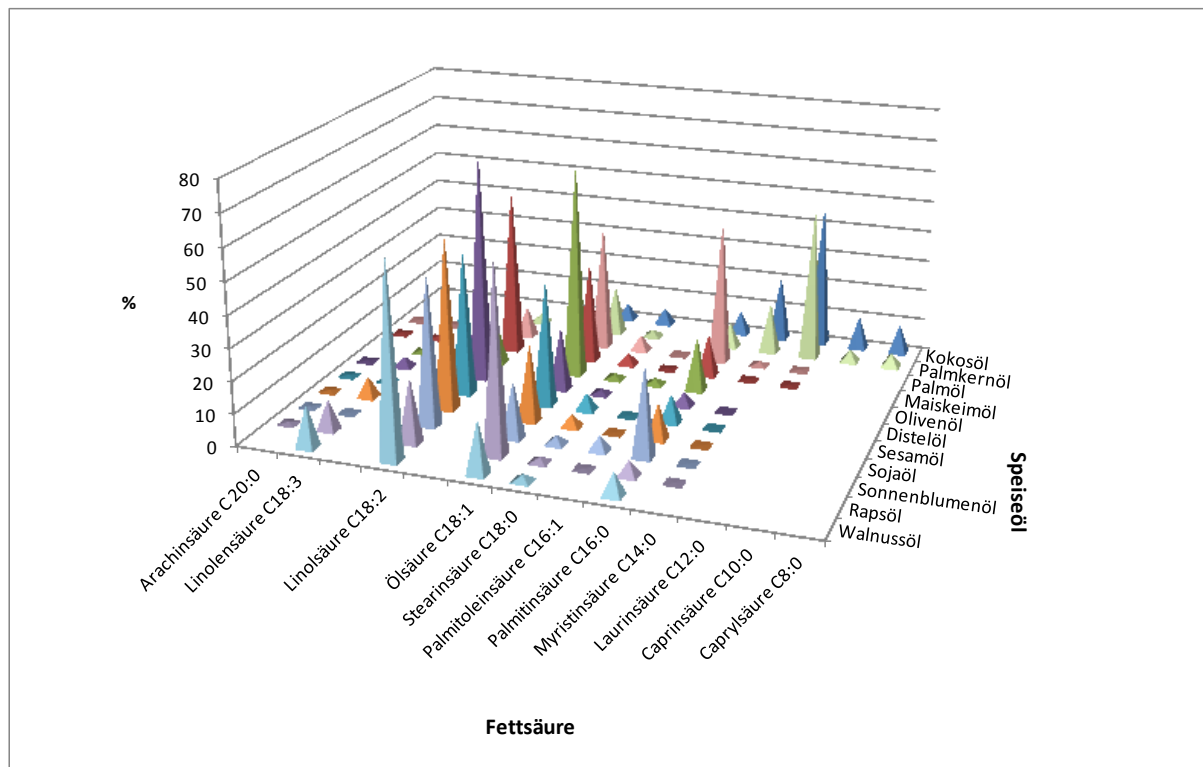


Abbildung 2 Fettsäurespektrum verschiedener Speiseöle nach Krist *et al.* (2008)

## 2.2 Gehalte in Lebensmitteln und Exposition

Das Vorkommen von ungebundenem 3-MCPD als herstellungsbedingte Kontaminante in Lebensmitteln ist bereits seit 1978 bekannt. Es entsteht als Nebenprodukt bei der Herstellung von hydrolysierten Pflanzenproteinen und Sojasoße; in einigen Würzsoßen wurden Gehalte von über 20 mg/kg Lebensmittel nachgewiesen (Velíšek *et al.* 1978). Während des Herstellungsprozesses dieser Würzsoßen werden 3-MCPD-Ester durch Filtration entfernt. In den folgenden Jahren wurde 3-MCPD in weiteren Lebensmitteln wie Brotkruste, Kaffee, Frühstücksflocken, Salami und pikanten Crackern im zweistelligen µg/kg-Bereich detektiert (Crews *et al.* 2002). Das Vorkommen von 3-MCPD-Fettsäureestern wurde erstmals 2006 durch die Untersuchung von 25 raffinierten Speisefetten und -ölen aus dem tschechischen Einzelhandel bekannt: In raffinierten Produkten wurde gebundenes 3-MCPD mit Gehalten bis zu 2,5 mg/kg Fett gemessen, während die Gehalte unraffinerter Öle unter der Nachweisgrenze von 100 µg/kg Fett lagen. Die Gehalte an ungebundenem 3-MCPD in Speiseölen lagen außer bei nativem Sojaöl (12 µg/kg Fett), nativem Haselnussöl (10 µg/kg Fett) und nativem Weizenkeimöl (24 µg/kg Fett) in allen Proben unter der Bestimmungsgrenze von 9 µg/kg Fett (Zelinková *et al.* 2006).

2007 wurden bei Analysen der amtlichen Lebensmittelüberwachung (CVUA Stuttgart) erstmals in Deutschland hohe Konzentrationen von 3-MCPD-Fettsäureestern in raffinierten

Speisefetten und –ölen sowie in daraus hergestellten Lebensmitteln gemessen (BfR 2007). Diese Werte wurden mit einer von Weißhaar publizierten Methode nach alkalischer Hydrolyse der 3-MCPD-Ester zu freiem 3-MCPD ermittelt (Weißhaar 2008).

Das BfR stellte 2007 bei seiner ersten überschlägigen Expositionsschätzung für nicht-gestillte Säuglinge eine erhebliche Überschreitung des TDI-Wertes (vgl. Absatz 2.3) fest, bedingt durch die hohe körpergewichtsbezogene Aufnahme von ausschließlich raffiniertem Fett in den ersten Lebensmonaten. Die Schätzungen beruhen auf den genannten Analyseergebnissen des CVUA Stuttgart mit einem Median von 2,57 mg/kg und einem Maximum von 4,17 mg/kg im Fettanteil des Trockenpulvers, entsprechend einer Exposition von 15,4 bzw. 25,0 µg/kg KG (Rechenbasis: Trockenpulver 15 g/100 ml trinkfertige Milch, 25 % Fettanteil im Milchpulver, Verzehr 160 ml/kg KG) (BfR 2007). Im Nachhinein zeigte sich, dass die damals verwendete Analysenmethode bei der Ermittlung der 3-MCPD-Gehalte Glycidol miterfasste, dass sich während der Analyse zu 3-MCPD umwandelte (vgl. Absatz 2.4).

Differenzierte Daten für gebundenes 3-MCPD und Glycidol in Säuglingsmilchnahrung ermittelte das CVUA Stuttgart für die Folgejahre 2009/2010 mit der in Abschnitt 2.4.1 beschriebenen Differenzmethode. Die Medianwerte für 3-MCPD betrugen 2,03, 2,14 bzw. 1,94 mg/kg Fett im April 2009, im Oktober 2009 bzw. im Mai 2010; die entsprechenden Maximalwerte betrugen 3,34, 2,84 bzw. 3,02 mg/kg Fett (Weißhaar 2010). Für gebundenes Glycidol wurden für die genannten Zeitpunkte Medianwerte von 0,95, 0,30 bzw. < 0,15 mg/kg Fett ermittelt; die Maximalwerte betrugen 5,33, 3,01 bzw. 2,58 mg/kg Fett. Für gebundenes Glycidol spiegeln sich hier vermutlich bereits die ersten Erfolge bei der Reduktion der Gehalte durch Veränderung der Prozessbedingungen bei der Raffination wieder (z. B. Reduktion der Desodorierungstemperatur); eine wesentliche Senkung der Gehalte an gebundenem 3-MCPD war offensichtlich auf diese Weise nicht möglich (Weißhaar 2010). Für die Expositionsschätzung von nicht-gestillten Säuglingen gegenüber gebundenem Glycidol hatte das BfR 2009 in seiner ersten Abschätzung einen Gehalt von 1 mg/kg Fett angenommen. Bei Verwendung der oben genannten Rechenbasis ergibt sich eine tägliche Aufnahme von 6 µg/kg KG in den ersten Lebensmonaten.

Systematische Untersuchungen bezüglich der Belastung von Lebensmitteln mit gebundenem 3-MCPD, 2-MCPD und Glycidol, die für eine Expositionsschätzung des Verbrauchers notwendig sind, liegen nicht vor. Die bisher veröffentlichten Untersuchungsergebnisse sind, bedingt durch unterschiedliche analytische Ansätze, zudem nur beschränkt vergleichbar. Seit Bekanntwerden der Problematik in Deutschland Ende 2007 arbeitet die Industrie an Reduzierungsstrategien (vgl. Absatz 2.5). Kuhlmann untersuchte 2011 mit einer indirekten Analysenmethode diverse Speiseöle: Hohe Gehalte an gebundenem Glycidol wiesen Kokosöl (bis zu 3,0 mg/kg Fett) und Palmkernöl (bis zu 2,5 mg/kg Fett) auf. Walnuss- und Haselnussöl wiesen mit bis zu 19 mg/kg Fett die höchsten Gehalte an gebundenem 3-MCPD

auf (Kuhlmann 2011a). Bezüglich der Belastung mit gebundenem 2-MCPD gibt es bisher erst wenige Untersuchungen (Andres *et al.* 2013). Kuhlmann konnte aufgrund fehlender Standardsubstanzen den Gehalt an gebundenem 2-MCPD nur abschätzen: In raffinierten Palmölproben wurden Gehalte zwischen 0,2 und 5,9 mg/kg geschätzt. Mit 0,3 mg/kg waren Soja-, Raps- und Sonnenblumenöl gering belastet, während Walnuss-, Traubenkern- und Haselnussöl mit bis zu 9,6, 2,4 und 11,0 mg/kg am höchsten belastet waren. Unraffinierte, native Öle enthielten hingegen keine der 3 Verbindungen (Kuhlmann 2011a).

In Deutschland werden etwa 3 Millionen Tonnen Pflanzenöle jährlich für die Ernährung eingesetzt. 95 % der produzierten Pflanzenöle werden raffiniert, um sie genusstauglich und lagerstabil zu machen (FEI 2011).

Lebensmittel, die zur Exposition des Verbrauchers gegenüber 3-MCPD beitragen, sind neben raffinierten Speisefetten und -ölen solche Lebensmittel, die raffinierte Speisefette enthalten wie Margarine, fetthaltige pflanzliche Brotaufstriche, süße Haselnuss- bzw. Schokoladenaufstriche sowie Süßigkeiten mit Nussfüllmassen bzw. Keksfüllungen (Weißhaar 2011; CVUA Stuttgart 2007). Durch die Kontamination von Frittierfetten wurden auch hohe Gehalte an gebundenem 3-MCPD in frittierten Lebensmitteln wie Pommes frites (Mittelwert (MW) 6,1 mg/kg bezogen auf den Fettgehalt) und Doughnuts (MW 1,21 mg/kg Fett) gemessen (Svejkovská *et al.* 2003).

Eine der wenigen Hinweise dafür, dass gebundenes MCPD in natürlichen, unprozessierten Lebensmitteln vorkommen kann, sind die Untersuchungen von Cerbulis *et al.* (1984) und Zelinková *et al.* (2008): Bereits Cerbulis *et al.* (1984) publizierten das Vorkommen von 3-MCPD-Fettsäureestern in Ziegenmilch. Die Autoren untersuchten eine Poolprobe von fünf Milchproben aus unterschiedlichen geographischen Gegenden in Pennsylvania und New Jersey sowie eine Poolprobe von vier von Hand gemolkenen Ziegen aus Pennsylvania (Cerbulis *et al.* 1984). Bei der Dünnschichtchromatographie der neutralen Lipidfraktion wurde in beiden Ziegenmilchproben eine kleine unbekannte Fraktion beobachtet, die vor der Triglyceridfraktion eluierte. Die Fraktion wurde isoliert und aufgereinigt. Als Hauptkomponenten wurden 3-MCPD-Diester identifiziert. Zwei Jahre später wies die Arbeitsgruppe qualitativ 3-MCPD-Diester in Humanmilch, nicht aber in Kuhmilch oder Butter nach (Kuksis *et al.* 1986). Zur Freisetzung des 3-MCPD aus den Estern wurde hier erstmals eine säurekatalysierte Esterhydrolyse mittels Methanol-Salzsäure durchgeführt, 3-MCPD wurde mit GC-MS gemessen.

Zelinková *et al.* (2008) detektierten hohe Gehalte an 3-MCPD-Estern in Humanmilch. Der durchschnittliche Gehalt lag bei 35,5 µg/kg Milch, der Maximalwert lag bei 76,0 µg/kg Milch. Berechnungen analog denen zur Aufnahme belasteter Säuglingsmilch ergeben eine Exposition von 5,7 bzw. 12,2 µg/kg KG (Rechenbasis: Verzehr 160 ml Milch pro kg KG). Damit

ergibt sich überraschenderweise, dass gestillte Kinder im Vergleich zu nicht-gestillten zwar durchschnittlich geringer, aber dennoch hoch mit Überschreitung des TDI-Wertes für 3-MCPD von 2 µg/kg KG belastet sein würden.

Die Untersuchungen der Human- und Ziegenmilchproben zeigten, dass das Fettsäureprofil der 3-MCPD-Ester dem endogenen Fettsäureprofil entsprach, was ein Hinweis darauf sein könnte, dass 3-MCPD-Ester endogen (re-)synthetisiert werden (Kuksis *et al.* 1986).

GE sind in Humanmilch nicht zu erwarten, da Glycidol als sehr reaktive Substanz nach Resorption im Körper vermutlich innerhalb kurzer Zeit mit Proteinen und anderen Molekülen reagiert.

## **2.3 Gefährdungspotential und Risikocharakterisierung**

### **2.3.1 3-MCPD**

Kurz- und Langzeitstudien zur oralen Toxizität von (freiem) 3-MCPD an Nagetieren haben gezeigt, dass mit Blick auf den kritischen Effekt Veränderungen der Niere am bedeutendsten sind. Hierbei haben sich männliche Ratten als besonders sensibel herausgestellt. In einer 2-Jahres-Studie mit männlichen F344 Ratten zeigte sich bei hohen Dosierungen eine erhöhte Inzidenz gutartiger Tumoren in einigen Organen (Sunahara *et al.* 1993, zitiert in BfR 2007). Mit Blick auf die Risikobewertung wurden Hyperplasien der Nierentubuli als empfindlichster Endpunkt identifiziert; diese Veränderungen traten bereits bei der niedrigsten Dosierung von 1,1 mg/kg KG täglich auf. Das „Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives“ (JECFA) kam 2002 aufgrund dieser und weiterer Daten zu der Einschätzung, dass für die beobachteten Tumore ein Schwellenwertmechanismus angenommen werden kann (nicht-geotoxisches Kanzerogen), und leiteten einen Wert für den „Tolerable Daily Intake“ (TDI) von 2 µg 3-MCPD/kg KG ab (WHO 2002). Auch eine jüngere Langzeitstudie an einem anderen Ratten-Stamm (Sprague-Dawley) (Cho *et al.* 2008) stützt diese Risikobewertung (BfR 2012). Von der IARC wurde 3-MCPD 2011 als „mögliches Humankarzinogen“ eingestuft (Kategorie 2B, possibly carcinogenic to humans).

Für 3-MCPD-Ester lagen bis vor Kurzem keine toxikologischen Daten vor. Das BfR ging bei seiner ersten Risikobewertung (BfR 2007) von der konservativen Annahme aus, dass 3-MCPD-Ester bei der Verdauung vollständig hydrolysiert werden und 3-MCPD im Organismus in gleichem Maße bioverfügbar wird wie bei Applikation der gleichen molaren Menge von freiem 3-MCPD. Die Berechtigung dieser Annahme wurde inzwischen durch kinetische Untersuchungen an Ratten bestätigt, bei denen die im Organismus nachweisbare Menge an 3-MCPD nach Applikation von 3-MCPD-Dipalmitat nur geringfügig kleiner war (86 %) als bei Applikation der gleichen Menge an freiem 3-MCPD (Abraham *et al.* 2013). Zudem zeigte

eine subchronische Toxizitätsstudie mit freiem 3-MCPD im Vergleich zu 3-MCPD-Dipalmitat an Ratten, dass die beobachteten Effekte bei Applikation des Esters nur geringfügig weniger ausgeprägt waren, vermutlich kinetisch bedingt durch die etwas geringere interne Exposition (Barocelli *et al.* 2011; BfR 2012).

Die vom BfR 2007 gemachte erste überschlägige Expositionsschätzung für nicht-gestillte Säuglinge ergab für den Median-Wert in Säuglingsmilchnahrung (2,57 mg/kg Fett, vgl. Absatz 2.2) eine 3-MCPD-Exposition in den ersten Lebensmonaten von 15,4 µg/kg KG und somit eine Überschreitung des TDI-Wertes um den Faktor 7,7. Für den Maximalwert von 4,17 µg/kg KG ergab sich eine Überschreitung um den Faktor 12,5 (BfR 2007). Diese Überschreitung war deutlich höher als die von Erwachsenen unter Worst-Case-Bedingungen (Verzehr von 80 g raffiniertem Fett mit einem Gehalt an gebundenem 3-MCPD von 7,36 mg/kg Fett bei Männern: Faktor 5,0 (BfR 2007)). Entsprechend wurde insbesondere für Säuglingsmilchnahrung die Forderung nach einer schnellen und deutlichen Reduktion der Gehalte an 3-MCPD-Estern erhoben; um den TDI-Wert nicht zu überschreiten, darf der Gehalt an gebundenem 3-MCPD auf der Rechenbasis des BfR maximal 0,33 mg/kg Fett betragen. In der Öffentlichkeit wurden die Befunde zurückhaltend kommuniziert, da es für nicht-gestillte Säuglinge keine Alternative zur Säuglingsmilchnahrung gibt und eine Verunsicherung von Eltern vermieden werden sollte.

Gesetzliche Höchstgehalte für gebundenes 3-MCPD sind bisher nicht etabliert worden; in der EU bestehen lediglich Höchstwerte für die Kontamination von hydrolysiertem Pflanzenprotein und Sojasoße mit (freiem) 3-MCPD (EC 2001).

### 2.3.2 Glycidol

Glycidol ist, bedingt durch seine Epoxid-Struktur, eine sehr reaktive Substanz mit alkylierenden Eigenschaften. Sie wird als Kanzerogen mit gentoxischem Wirkmechanismus bewertet, die nach oraler Applikation in verschiedenen Geweben eine Krebsbildung auslösen kann. Von der IARC wurde Glycidol als „probably carcinogenic to humans“ (Kategorie 2A) eingestuft (BfR 2009).

Entsprechend seinem Wirkungsspektrum kann für Glycidol kein toxikologisch unbedenklicher Schwellenwert bzw. kein TDI-Wert abgeleitet werden. In Bezug auf die orale Langzeit-Exposition gegenüber kleinen Glycidol-Mengen ist das Risiko für die mögliche Entstehung von Krebs als wichtigster Endpunkt anzusehen. Eine quantitative Beschreibung des Gefährdungspotenzials ermöglichen die Studien des „National Toxicology Program“ (NTP 1990). Mäuse und Ratten erhielten über 2 Jahre Glycidol über eine Schlundsonde. Das BfR nahm eine Auswertung dieser Daten vor und ermittelte einen rechnerischen BMDL10-Wert

(unteres 95 % Konfidenzintervall für einen 10 %igen Effekt) von 4,06 mg/kg KG täglich (BfR 2009). Entsprechend dem Bewertungskonzept der EFSA für gentoxische Kanzerogene sollte der Sicherheitsabstand zur Exposition des Menschen mindestens Faktor 10000 betragen („Margin of Exposure“, MoE), um das Risiko als „low concern“ zu bewerten (EFSA 2005).

Für GE lagen bis vor Kurzem keine toxikologischen Daten vor. Das BfR ging bei seiner ersten Risikobewertung (BfR 2009) wie bei 3-MCPD-Estern von der konservativen Annahme aus, dass GE bei der Verdauung vollständig hydrolysiert werden und Glycidol im Organismus in gleichem Maße bioverfügbar wird wie bei Applikation der gleichen molaren Menge von freiem Glycidol. Die Berechtigung dieser Annahme wurde inzwischen durch kinetische Untersuchungen an Ratten bestätigt, denen freies Glycidol bzw. die gleiche molare Menge an Glycidyl-Palmitat appliziert wurde. Als Parameter der internen Exposition wurden Hämoglobinaddukte gemessen, bei denen sich lediglich eine geringe zeitliche Verzögerung bei der Ester-Applikation auf ein von der Höhe her gleiches Niveau zeigte. Auch bei der Ausscheidung des Stoffwechselprodukts Dihydroxypropyl-Merkaptursäure im Sammelurin zeigten sich für beide Applikationen vergleichbare Werte (Appel *et al.* 2013). Eine ähnliche Interpretation in Bezug auf die Bioverfügbarkeit von Glycidol bei Applikation eines Glycidyl-Esters ergibt sich aus einer kinetischen Untersuchung mit Glycidol im Vergleich zu Glycidyl-Linoleat an Ratten (Wakabayashi *et al.* 2012). Die Autoren untersuchten auch Javaneraffen (*Macaca fascicularis*); bei ihnen zeigte sich im Vergleich zu den Ratten allerdings eine deutlich geringere orale Bioverfügbarkeit für Glycidol und insbesondere für den untersuchten Glycidyl-Ester. Die Interpretation dieser Spezies-Differenzen in Hinblick auf die Bedeutung für den Menschen ist derzeit offen, diskutiert wird insbesondere der mögliche Einfluss des pH-Wertes im Magen (mögliche Umwandlung von Glycidol zu 3-MCPD (BfR 2009)).

Die vom BfR 2009 gemachte erste überschlägige Expositionsschätzung für nicht-gestillte Säuglinge ergab für einen angenommenen Gehalt an gebundenem Glycidol von 1 mg/kg Fett in Säuglingsmilchnahrung (vgl. Abschnitt 2.2) eine Glycidol-Exposition in den ersten Lebensmonaten von 6 µg/kg KG. Dies entspricht einem MoE-Wert von 670, der somit deutlich unter dem mindestens anzustrebenden Wert von 10000 liegt, bei dem das Risiko lediglich als „low concern“ bewertet wird. Wie bei 3-MCPD-Fettsäureestern wurde insbesondere für Säuglingsmilchnahrung die Forderung nach einer schnellen und deutlichen Reduktion der Gehalte an Glycidyl-Estern erhoben (BfR 2009).

Abgesehen von dem allgemeinen Grundsatz, Kontaminationen auf so niedrige Werte zu begrenzen, wie sie durch gute Herstellungspraxis sinnvoll erreicht werden können (ALARA-Prinzip: „as low as reasonably achievable“), bestehen zurzeit keine gesetzlichen Regelungen für gebundenes Glycidol. Um auf der oben genannten Rechenbasis des BfR einen MoE von 10000 zu erreichen, darf der Gehalt an gebundenem Glycidol in Säuglingsmilchnahrung maximal 0,067 mg/kg Fett betragen.



### 2.3.3 2-MCPD

Zu freiem als auch estergebundenem 2-MCPD liegen bisher keine geeigneten Studien vor, die eine Risikobewertung mit Ableitung eines TDI-Wertes erlauben würden (Andres *et al.* 2013).

## 2.4 Analytik von gebundenem MCPD und Glycidol

Seit Bekanntwerden der Problematik der 3-MCPD-Fettsäureester wurden in den vergangenen Jahren eine Vielzahl von Methoden mit sehr unterschiedlichen analytischen Herangehensweisen entwickelt. Fast alle Methoden sind bisher nur in-house und nur für Speiseöle, nicht aber für andere fetthaltige Lebensmittel validiert. Methodenvergleichsstudien sind derzeit rar, zertifiziertes Referenzmaterial ist bisher nicht verfügbar. Im Folgenden werden die Methodenansätze vorgestellt, die sich bisher durchgesetzt haben und die für die Analysen im Rahmen der vorliegenden Arbeit von Bedeutung sind.

Prinzipiell gibt es zwei Möglichkeiten der Bestimmung von gebundenem MCPD und Glycidol: Die direkte Messung der einzelnen intakten Ester, sowie die als indirekte Bestimmung bezeichnete Messung des freigesetzten MCPDs bzw. Glycidols nach der Hydrolyse der Ester.

Bei der Anwendung von direkten Methoden werden die intakten Ester mit LC-MS, LC-MS/MS oder LC-ToF-MS ohne chemische Umwandlung einzeln quantifiziert.

### 2.4.1 Indirekte Methoden

Bei der Anwendung indirekter Methoden erfolgt zunächst die Hydrolyse der Ester, es entstehen Fettsäuremethylester und freies 3-MCPD, 2-MCPD bzw. Glycidol. Das freigesetzte MCPD wird aufgrund der hohen Polarität und niedrigen Volatilität derivatisiert. In der Regel dient als Derivatisierungsmittel Phenylboronsäure (PBA), der cyclische Boronsäureester wird mit GC-MS detektiert. Glycidol muss nach der Esterhydrolyse wegen des niedrigen Molekulargewichts und der hohen Reaktivität in ein stabileres Molekül (3-MCPD oder 3-Monobrompropandiol (3-MBPD)) umgesetzt werden, das analog zu MCPD derivatisiert und detektiert wird. Analysenergebnis indirekter Methoden ist die jeweilige Summe des in der Probe enthaltenen Glycidols, 3-MCPD bzw. 2-MCPD, es gibt keine Information über die detaillierte Struktur der einzelnen Ester in Bezug auf die Fettsäurezusammensetzung.

Die Esterhydrolyse kann Säure- oder alkalisch katalysiert erfolgen. Die Hydrolyse von 3-MCPD-Estern mittels Methanol/Schwefelsäure wurde von (Divinová *et al.* 2004) etabliert.

Die alkalisch katalysierte Esterhydrolyse von 3-MCPD-Estern wurde 2008 von Weißhaar entwickelt unter der Verwendung von Natriummethylat zur Esterhydrolyse und Natriumchlorid zum Aussalzen (Weißhaar 2008). Der Schritt des Aussalzens ist verbunden mit der Neutralisation des Probenansatzes nach der Esterhydrolyse. Während der alkalisch katalysierten Esterhydrolyse ist dies der kritische Schritt bezüglich der Spezifität von Analysenmethoden: Die Verwendung von Natriumchlorid führt dazu, dass aus den in manchen Proben ebenfalls enthaltenen GE zusätzliches 3-MCPD gebildet wird und eine Summe aus gebundenem 3-MCPD und Glycidol erfasst wird (Weißhaar und Perz 2010). Eine Verbesserung des Verfahrens wurde unter anderem dadurch erreicht, dass bei Methoden für die Bestimmung von gebundenem MCPD auf die Verwendung von Natriumchlorid verzichtet wird. Das BfR validierte zwei Methoden zur Bestimmung von gebundenem 3-MCPD, bei denen für Neutralisation und Aussalzen Ammoniumsulfat verwendet wird (Wöhrlin *et al.* 2011; Fry *et al.* 2013).

Indirekte Methoden zur Quantifizierung von gebundenem Glycidol sind so konzipiert, dass gleichzeitig gebundenes 3-MCPD bestimmt wird (Ermacora und Hrnčirik 2012; Kuhlmann 2011a; DGF 2010). Seitdem kommerziell auch 2-MCPD(-Ester)-Standardsubstanzen erhältlich sind, ist zudem die parallele Messung von gebundenem 2-MCPD möglich.

Erste Methoden zur indirekten Bestimmung von Glycidol nutzen die Schwachstelle der alkalisch katalysierten indirekten Bestimmung von 3-MCPD-Estern aus: Mit sogenannten Differenzmethoden wird die zu untersuchende Probe doppelt aufgearbeitet (Ansatz A+B). Weißhaar bestimmte in Ansatz A die Summe an 3-MCPD, das aus 3-MCPD bildenden Substanzen (hauptsächlich 3-MCPD-Ester und GE) gebildet wurde. In Ansatz B wurde der 3-MCPD-Gehalt bestimmt, der sich ergibt, wenn die GE durch vorherige Behandlung der Probe mit Methanol-Schwefelsäure abgebaut werden. Aus der Differenz zwischen den 3-MCPD-Gehalten der beiden Ansätze wurde unter Verwendung eines stöchiometrischen Faktors von 0,67, der Glycidol-Gehalt berechnet. Dieser Faktor ergibt sich aus dem unterschiedlichen Molekulargewicht von 3-MCPD und Glycidol. Zeitweise wurde diese Methode als Standardmethode der Deutschen Gesellschaft für Fettforschung (DGF) (DGF-Standard Methode C-III 18 (09)) aufgenommen. Mehrere Untersuchungen zeigen jedoch, dass die Vorbehandlung der Probe mit Schwefelsäure das enthaltene Glycidol nicht vollständig eliminiert bzw. zur Bildung von MCPD führt (Shimizu *et al.* 2011; Kuhlmann 2011a; Shimizu *et al.* 2010; Kaze *et al.* 2011). Mittlerweile wurde diese Methode von der DGF zurückgezogen, eine überarbeitete Version wurde als DGF-Einheitmethode C-VI 17 (10) veröffentlicht. Sie beschreibt ein Verfahren zur Summenbestimmung des in der Probe enthaltenen gebundenen 3-MCPD und Glycidols. Durch dieses Verfahren kann nicht ermittelt werden, welchen Anteil das aus Glycidol generierte 3-MCPD an dem Gesamtergebnis hat.

Mit der DGF-Einheitmethode C-VI 18 (10) wird ein Verfahren beschrieben, mit dem zwischen gebundenem 3-MCPD und Glycidol unterschieden werden kann DGF (2010). Durch

die Verwendung von Natriumbromid wird die Umwandlung von Glycidol in zusätzliches 3-MCPD unterbunden. Das Prinzip der Methode ist in Abschnitt 3.1.2 beschrieben. Ein weiterer innovativer Ansatz ist der von Ermacora und Hrncirik (2012). Sie veröffentlichten eine Methode für die gleichzeitige indirekte Bestimmung von estergebundenem 2- und 3-MCPD und Glycidol mittels saurer Hydrolyse in einem Probenansatz (vgl. Abbildung 3). Durch Behandlung der Probe mit einer Lösung aus Natrium-Bromid und Schwefelsäure werden die intakten GE in 3-MBPD-Monoester umgewandelt. Erst dann erfolgt eine Säure-katalysierte Esterhydrolyse. Das gebundene 3-MCPD, 2-MCPD und 3-MBPD wird freigesetzt, derivatisiert und mit GC-MS gemessen.

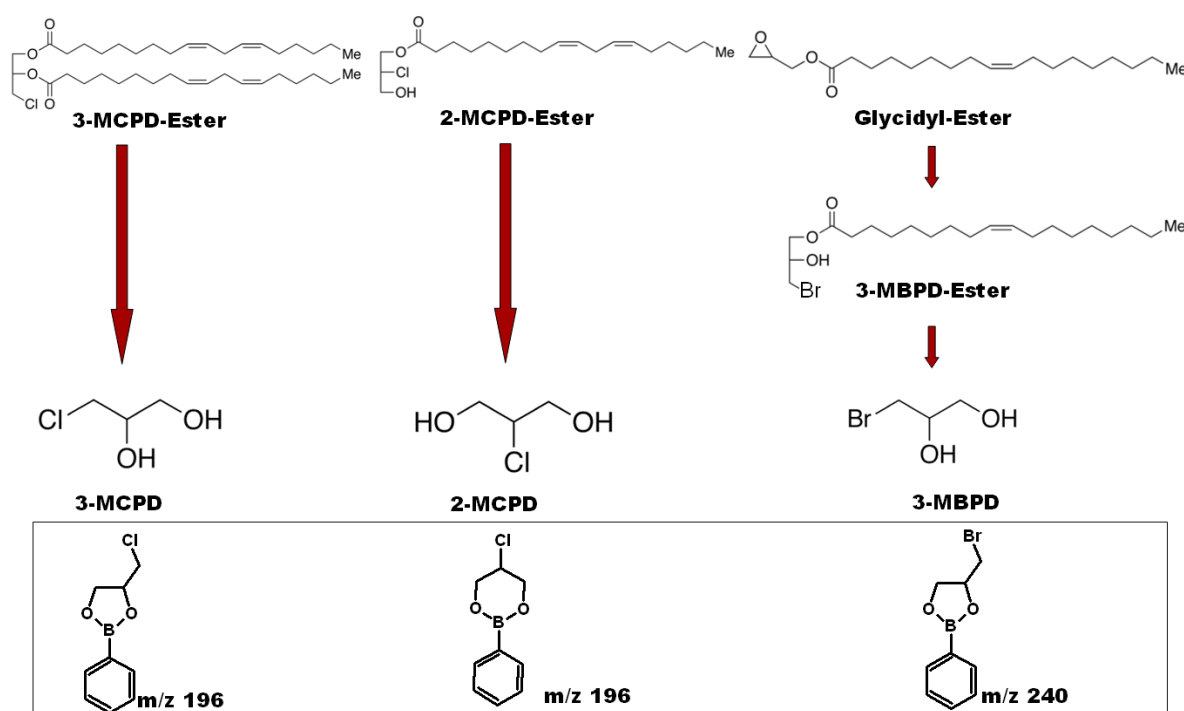


Abbildung 3 Prinzip der indirekten Bestimmung von estergebundenem 3-MCPD, 2-MCPD und Glycidol nach Umwandlung der GE in 3-MBPD-Ester. Analysenverfahren nach Ermacora und Hrncirik (2012).

#### 2.4.2 Direkte Bestimmung

Die Nachweis der intakten 3-MCPD-Ester und GE wurde ursprünglich mit GC-MS erbracht (Cerbulis *et al.* 1984; Weißhaar und Perz 2010). Mittlerweile haben sich flüssigkeitschromatografische Methoden gekoppelt mit Massenspektrometrie, teilweise auch mit Time of Flight (ToF)-Methoden, durchgesetzt (Dubois *et al.* 2011; Haines *et al.* 2011; Hori *et al.* 2012; Masukawa *et al.* 2011; Becalski *et al.* 2012).

Aufgrund der Vielzahl an möglichen Analyten sind für den direkten Nachweis ebenso viele Standardsubstanzen notwendig, was insbesondere die Analytik der MCPD-Ester aufwendig und teuer macht. Nicht für jeden 3- und 2-MCPD Mono- und Diester sind Standardsubstan-

zen kommerziell erhältlich. Im Vergleich zu den 3- und 2-MCPD-Estern ist die direkte Bestimmung von GE einfacher, da Glycidol nur mit einer Fettsäure verestert ist und dadurch die Anzahl der Analyten überschaubar ist. Mit der direkten Bestimmung von MCPD-Estern kann zwischen MCPD-Mono- und MCPD-Diestern unterschieden werden, eine Unterscheidung zwischen 2-MCPD- und 3-MCPD-Estern ist jedoch nicht möglich (Dubois *et al.* 2012).

Die Methoden unterscheiden sich teilweise erheblich hinsichtlich der Probenvorbereitung sowie der verwendeten Messmethode. Haines *et al.* (2011) verdünnten die flüssigen Ölproben für die Bestimmung von fünf 3-MCPD-Monoestern und fünfzehn 3-MCPD-Diestern mittels LC-ToF-MS lediglich in Lösungsmittel und injizierten sie ohne weitere Aufreinigungsschritte, was zu einer hohen Belastung des Massenspektrometers nach der Injektion nur weniger Proben führte. Masukawa *et al.* (2011) entwickelten für die Bestimmung von fünf GE ein aufwändiges doppeltes SPE-Verfahren. Die Messung erfolgte mit LC-MS mit chemischer Ionisation unter Atmosphärendruck (APCI), da mit Tandemmassenspektrometrie keine charakteristischen Produktionen identifiziert werden konnten. Die Messung mit APCI war zehnfach empfindlicher als die mit Elektrospray-Ionisation (ESI). Für jeden Analyten wurde ein Quantifizierungsion aufgenommen, jedoch keine Bestätigungsionen. Das Verfahren wurde mehrfach hinsichtlich Probenvorbereitung und HPLC-Bedingungen überarbeitet (Shiro *et al.* 2011b). Mittlerweile wurde diese Methode von der Amerikanischen Öl-Chemiker-Gesellschaft (American Oil Chemists' Society, AOCS) validiert und als Joint AOCS/JOCS Official Method Cd 28-10 veröffentlicht (AOCS 2012). Sie ist derzeit Gegenstand einer Methodenvergleichsstudie, ebenfalls organisiert von AOCS.

Dubois *et al.* verwendeten für die direkte Bestimmung von sieben GE zur Probenaufarbeitung eine Kombination aus Gelpermeationschromatografie (GPC) und SPE. Zur Messung wurden sowohl ein LC-ToF-MS sowie ein LC-MS/MS-Gerät verwendet. Die Quantifizierung erfolgte mittels LC-ESI-MS/MS. Aufgrund des Fehlens adäquater interner Standardsubstanzen wurde eine automatisierte Standard-Addition verwendet (Dubois *et al.* 2011).

Neben der Vielzahl an möglichen Analyten ist für direkte Nachweismethoden die Probenvorbereitung eine Herausforderung, da sich die chemischen Eigenschaften der Analyten nur unwesentlich von den in der Probe vorliegenden Mono- und Diacylglyceriden unterscheiden und eine Abtrennung schwierig ist.

## 2.5 Bildung von hitzebedingten Kontaminanten in Speiseölen und Reduzierungsstrategien

3-MCPD-, 2-MCPD- und Glycidyl-Fettsäureester zählen zu den herstellungsbedingten Kontaminanten. Sie entstehen während der Raffination von Speisefetten und -ölen. Der entscheidende Schritt ist dabei die Desodorierung (Franke *et al.* 2009; Weißhaar und Perz 2010). Bei dieser letzten Stufe der Fettraffination werden Speiseöle Temperaturen von über 230°C ausgesetzt, um unerwünschte Begleitstoffe (beispielsweise volatile Substanzen, die Geruch und Geschmack bestimmen) durch Wasserdampfdestillation unter Vakuum zu entfernen. Nicht raffinierte, native Speisefette enthalten diese Verbindungen nicht (Weißhaar 2008). Die Bildungsmechanismen sind bisher nicht vollständig geklärt. Ein möglicher Entstehungsweg der MCPD-Ester ist die Hydrolyse von Triglyceriden zu Diglyceriden gefolgt von der Bildung einer reaktiven Acyloxoniumion-Zwischenstufe. Nach nukleophiler Substitution mit Chloridionen bilden sich MCPD-Ester (Velíšek *et al.* 2002).

Die Bildung von GE ist vermutlich unabhängig von der Bildung der MCPD-Ester. Ein möglicher Entstehungsweg der GE ist die intra-molekulare Umwandlung, mit Abspaltung einer Fettsäure aus Diacylglyceriden oder die Wasserabspaltung aus Monoacylglyceriden (Destailats *et al.* 2012).

Unterschiedliche Speiseöle unterscheiden sich hinsichtlich ihres Bildungspotenzials: Insbesondere Palmöl, Maiskeimöl und Kokosöl weisen unter standardisierten Desodorierungsbedingungen hohe Gehalte auf, während Raps- oder Sojabohnenöl ein geringes Bildungspotenzial aufweisen (Matthäus *et al.* 2011b). Nicht in jedem Öl sind dieselben Vorläuferionen und dieselben Raffinationsbedingungen für die Entstehung der Ester verantwortlich (Craft *et al.* 2012). Als mögliche Vorstufen werden Mono- und Diglyceride bzw. im Rohöl enthaltenes Chlorid diskutiert (Nagy *et al.* 2011), eine Korrelation zwischen Diglyceridgehalt und Bildung von MCPD-Estern gibt es jedoch nicht (Matthäus *et al.* 2011b). Für die Bildung von GE sind jedoch hohe Diglyceridgehalte im Rohöl sowie Desodorierungstemperaturen von über 230°C entscheidend (Craft *et al.* 2012).

Für die Reduzierung der Esterbildung während der Fettraffination stehen zurzeit drei unterschiedliche Ansätze zur Verfügung: Die Auswahl und Vorbehandlung der Rohmaterialien, eine Veränderung der Prozessparameter (insbesondere Temperatur, Zeitdauer) bei der Raffination, sowie die Entfernung der Ester nach der Raffination durch verschiedene Adsorbermaterialien. Hohe Diglyceridgehalte entstehen in Palmöl durch enzymatische Vorgänge während der Reifung der Palmfrüchte. Um möglichst niedrige Diglyceridgehalte aufzuweisen, sollten Palmfrüchte deshalb möglichst rasch nach der Ernte verarbeitet werden (Craft *et al.* 2012). Es konnte gezeigt werden, dass das Waschen von Palmrohöl mit polaren Flüssigkeiten wie Wasser die Entstehung von MCPD-Estern um etwa ein Drittel reduzieren

kann (Matthäus *et al.* 2011b). Bei Palmöl zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen Proben aus verschiedenen Anbauländern, aber auch aus unterschiedlichen Anbaustandorten eines Landes (Matthäus *et al.* 2011a). Zusätze von Zitronensäure oder Diacetin vor der Desodorierung haben ebenfalls protektive Wirkung. Beide Verbindungen können durch Behandlung mit Adsorbermaterialien (Zeolithe, synthetisches Magnesiumsilikat) teilweise aus dem Endprodukt entfernt werden (FEI 2011).

## 2.6 Industriell hergestellte Säuglingsmilchnahrung

Industriell hergestellte Säuglingsmilchnahrungen lassen sich in 2 Gruppen einteilen, die sich in der Zusammensetzung des Kohlenhydratanteils unterscheiden: Anfangs- und Folgemilchen. Zur ersten Gruppe gehören Pre- und 1-Nahrung. Pre-Nahrung wird auf Basis von Kuhmilchproteinen hergestellt und ist der Muttermilch sowohl qualitativ als auch quantitativ am ähnlichsten. Sie enthält als einziges Kohlenhydrat Laktose und kann wie Muttermilch nach Bedarf des Kindes (ad libitum) gefüttert werden. Säuglingsmilchnahrung mit der Ziffer "1", hier als „1-Nahrung“ bezeichnet, enthält neben Laktose einen Anteil an Stärke (etwa 2 %), der eine länger anhaltende Sättigung und damit eine geringere Anzahl an Mahlzeiten pro Tag bewirken kann.

Säuglingsmilchnahrungen mit der Ziffer "2" (2-Nahrung, Folgemilchen) sind im Vergleich zu Säuglingsanfangsnahrung weniger an Muttermilch angepasst und haben mehr Ähnlichkeit mit Vollmilch. Sie sind für die Ernährung in den ersten 4 Lebensmonaten ungeeignet. Eine Umstellung von Säuglingsanfangsnahrungen auf Folgemilchen im ersten Lebensjahr ist ernährungsphysiologisch nicht erforderlich.

Die Anforderungen an die Zusammensetzung von Säuglingsanfangsnahrung (Pre- und 1-Nahrung) und Folgenahrung (2-Nahrung) sind in Europa in der Richtlinie 2006/141/EG (EG 2008) bzw. in Deutschland in der Diätverordnung (DiätV 2010), in der die europäische Richtlinie umgesetzt ist, geregelt. In der Verordnung wird zwischen Anfangsnahrung und Folgenahrung unterschieden sowie innerhalb dieser beiden Kategorien zwischen Nahrung auf Basis von Kuhmilch- oder Sojaprotein sowie Nahrung auf Basis von Proteinhydrolysaten (HA-Nahrung).

Nach der DiätV wird bezüglich der Anforderungen an die verwendeten Fette, mit Ausnahme des Mindestfettanteils, kein Unterschied zwischen Anfangs- und Folgenahrung gemacht. Die Angaben zum Mindestfettanteil beziehen sich nicht auf das in Verkehr gebrachte Milchpulver, sondern auf den Kaloriengehalt des nach den Anweisungen des Herstellers rekonstituierten, verzehrsfertigen Erzeugnisses. Anfangsnahrung muss mindestens 4,4 g Fett, aber höchstens 6,0 g Fett pro 100 kcal enthalten. Folgenahrung muss mindestens 4,0 g Fett, aber höchstens 6,0 g Fett pro 100 kcal enthalten. Der Minimal- und Maximalgehalt für

einzelne Fettsäuren (trans-Fettsäuren, mehrfach ungesättigte Fettsäuren) ist im Detail geregelt, nicht aber die Fettquelle.

Derzeit gibt es auf dem deutschen Markt ein gutes Dutzend verschiedener Handelsmarken für Säuglingsmilchnahrung (Handelsmarkenname im Folgenden in Klammer). Marktführer für Babynahrung ist Hipp (Hipp bio, Hipp bio combiotik, bebevita) mit einem Marktanteil von rund 45 %, gefolgt von Nestlé (BEBA und Alete, Milasan) und Milupa (milumil und Aptamil). Weiterer Hersteller ist das Deutsche Milchkontor (Humana). Hinzu kommen preisgünstige Marken der Drogeriehersteller Rossmann (babydream) und dm (babylove). Ein eher kleines Marktsegment dürften die Bio-Säuglingsmilchen von Holle und Lebenswert bio einnehmen, sowie die auf Ziegenmilch basierende Bio-Nahrung (bambinchen). Genaue Verkaufszahlen bzw. genaue Informationen über Marktanteile sind leider nicht verfügbar.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Indirekte Messung von gebundenem Glycidol und MCPD

Vorversuche zur indirekten Bestimmung von gebundenem MCPD und Glycidol erfolgten mit BfR-Methode 9 und der DGF-Einheitsmethode C-VI 18 (10).

##### 3.1.1 BfR-Methode 9

100 ( $\pm$  5) mg Fett wurden in 500  $\mu$ l t-BME gelöst und mit 20  $\mu$ l interner Standardlösung (0,4  $\mu$ g d<sub>5</sub>-3-MPCD bzw. d<sub>5</sub>-2-MPCD absolut, eingesetzt als 1,2-Bis-palmitoyl-3-Chloropropanediol-d<sub>5</sub> bzw. 1,3-Distearoyl-2-chloropropanediol-d<sub>5</sub>) versetzt. Die Esterhydrolyse erfolgte alkalisch katalysiert durch Zugabe von 200  $\mu$ l Natriummethylat-Lösung (in Methanol; 0,5 mol/l) für 9-10 min bei Raumtemperatur. Durch Zugabe von 600  $\mu$ l angesäuerter wässriger Ammoniumsulfatlösung (37,7 % w/v Ammoniumsulfat, 25 %-ige Schwefelsäure, 50:3 v/v) wurde die Reaktion abgestoppt. Anschließend wurden die Fettsäuremethylester durch flüssig-flüssig Extraktion mit 2 x 1 ml Isohexan aus der Probe entfernt. Das freie MCPD wurde mit 3 x 600  $\mu$ l Ethylacetat extrahiert und nach Zugabe von 100  $\mu$ l Phenylboronsäurelösung (gesättigt, in Diethylether) für 2-3 min im Ultraschallbad derivatisiert. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Stickstoffstrom verdampft, der trockene Rückstand in 200-500  $\mu$ l Aceton gelöst und in den GC-MS injiziert.

Die GC-MS-Messung und Auswertung sind in Anhang 6.6.5 und 6.7.3 beschrieben. Die Methode wurde im Rahmen zweier Ringversuche für Speisefette und -öle sowie für fetthaltige Lebensmittel validiert (Fry *et al.* 2013; Wöhrlin *et al.* 2011).

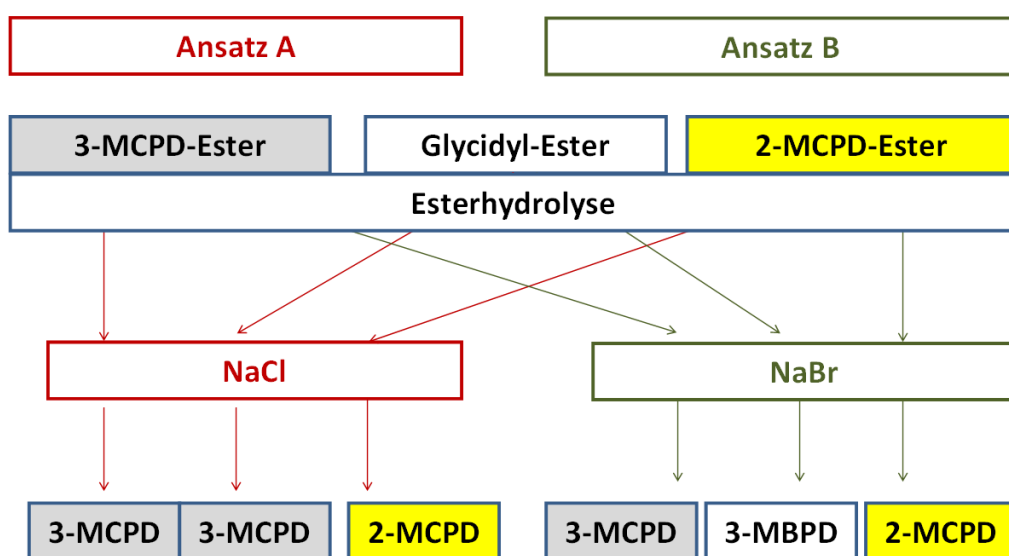
##### 3.1.2 DGF-Einheitsmethode C-VI 18 (10)

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Verhalten von GE unter den Bedingungen der DGF-Einheitsmethode C-VI 18 (10) getestet. Die Methode nutzt die alkalisch katalysierte Esterspaltung zur Hydrolyse der Ester. Die Probenaufarbeitung erfolgte nach der Methodenvorschrift (DGF 2010). Das Prinzip der Methode besteht darin, dass jede Probe im Parallelansatz auf verschiedene Weise aufgearbeitet wird (vgl. Abbildung 4). In Ansatz A wird der Gehalt an gebundenem Glycidol bestimmt, in Ansatz B der Gehalt an gebundenem 2- bzw. 3-MCPD. In Ansatz A wird zum Stopp der Esterhydrolyse eine angesäuerte Natriumchloridlösung verwendet. Das entstandene freie Glycidol wird durch Reaktion mit Chloridionen zu zusätzlichem 3-MCPD umgesetzt. In Ansatz B wird ein zweites Aliquot der



Probe aufgearbeitet und die Esterhydrolyse chloridfrei mit einer angesäuerten Natriumbromid-Lösung abgestoppt. Dadurch kann sich aus dem in der Probe freigesetzten Glycidol kein zusätzliches 3-MCPD bilden.

Bei der Analyse wurden  $2 \times 100 (\pm 0,5)$  mg Fett in 100 µl t-BME gelöst und mit 100 µl interner Standardlösung (0,5 µg  $d_5$ -3-MPCD bzw.  $d_5$ -2-MPCD absolut, eingesetzt als 1,2-Bis-palmitoyl-3-Chloropropanediol- $d_5$  bzw. 1,3-Distearoyl-2-chloropropanediol- $d_5$ ) versetzt. Die Esterhydrolyse erfolgte in beiden Ansätzen parallel durch Zugabe von 200 µl Natriumhydroxid-Lösung (in Methanol; 20 g/l) für 3,5-5,0 min bei Raumtemperatur. Durch Zugabe von 600 µl angesäuerter wässriger Natriumchloridlösung (1 l NaCl-Lösung (200 g/l) + 35 ml 25 %ige Schwefelsäure) wurde die Reaktion in Ansatz A abgestoppt. Durch Zugabe von 600 µl angesäuerter wässriger Natriumbromidlösung (600 g/l + 35 ml 25 %ige Schwefelsäure) wurde die Reaktion in Ansatz B abgestoppt. Anschließend wurden beide Ansätze analog aufgearbeitet: Die Fettsäuremethylester wurden durch Flüssig-Flüssig Extraktion mit  $2 \times 600$  µl Isohexan aus der Probe entfernt. Das freie MCPD wurde mit  $3 \times 600$  µl Diethylether/Ethylacetat (6/4 v/v) extrahiert; die Lösungen wurden über Natriumsulfat getrocknet und nach Zugabe von 100 µl Phenylboronsäurelösung (gesättigt, in Diethylether) und 10 s Schütteln (Vortex) derivatisiert. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Stickstoffstrom verdampft, der trockene Rückstand in 500 µl Isooktan gelöst und in den GC-MS injiziert.



$$\text{Glycidol (mg/kg)} = (\text{3-MCPD (A) (mg/kg)} - \text{3-MCPD (B) (mg/kg)}) * \text{TF}$$

Abbildung 4 Prinzip der DGF-Einheitsmethode C-VI 18 (10)

Für die Berechnung des Glycidol-Gehaltes wurde die Differenz der beiden 3-MCPD-Gehalte aus Ansatz A und B mit einem Transformationsfaktor (TF) multipliziert. Der TF beschreibt, in welchem Ausmaß 3-MCPD unter den gegebenen Reaktionsbedingungen aus Glycidol gebildet wird. Zur Ermittlung des TF wurde ein unbelastetes Öl mit verschiedenen Konzentrationen an Glycidol (eingesetzt als Glycidyl-Stearat) dotiert und nach Ansatz A parallel aufgearbeitet. Der Kehrwert der Steigung der ermittelten Kalibriergeraden ist der TF.

Das verwendete GC-MS System ist in Anhang 6.6.5 beschrieben, die Basiseinstellung des GC-MS entsprechen denen die im Anhang 6.7.3 für die Untersuchung flüssiger Milchproben aufgeführt sind.

### **3.2 Direkte Messung von GE mittels GC-MS und GC-MS/MS**

Vorversuche wurden mit einem GC-MSD der Firma Agilent durchgeführt (6.6.5). Für die massenspektrometrische Detektion der intakten GE im SIM-Modus wurde eine polare Säule mit einer Polyethylenglykol-Belegung verwendet.

#### Prinzip der Triple Quadrupol Messung

Für den direkten Nachweis der GE wurden Messungen mit einem Triple Quadrupol GC/MS System der Firma Agilent durchgeführt. Im Vergleich zur Kopplung eines Gaschromatografen mit einem Single Quadrupol Massenspektrometer, wie er für den Nachweis von freiem MCPD bzw. MBPD verwendet wurde, besteht bei dieser Technik die Möglichkeit, spezifische Ionenübergänge zu messen. Besonders bei Vorliegen eines komplizierten Matrixuntergrunds der Probe bietet die Triple Quad Messung oft bessere Selektivität und weist dadurch wesentlich niedrigere Nachweisgrenzen auf.

Das Triple Quad MS besteht aus einer Ionenquelle gefolgt von einem ersten Quadrupol (Q1), durch den ausgewählte Ionen durch das Anlegen entsprechender Spannungen anhand ihres Masse-zu-Ladungs-(m/z-) Verhältnisses gefiltert werden. Diese Vorläuferionen gelangen dann in die Kollisionszelle, bestehend aus einem Hexapol, der mit einem Gemisch aus Helium und Stickstoff gefüllt ist. In der Kollisionszelle wird den Ionen durch Stöße mit dem Inertgas Energie zugeführt, daraufhin zerfallen die Ionen sehr spezifisch zu Fragmentationen und gelangen anschließend in den zweiten Quadrupol (Q3), wo sie wiederum durch Anlegen entsprechender Spannungen gefiltert und isoliert werden, bevor sie den Detektor erreichen.

Die Quadrupole können so programmiert werden, dass entweder alle (Scan) oder nur Ionen mit einem bestimmten Masse-zu-Ladungs-Verhältnis auf einer stabilen Flugbahn passieren können. So können die beiden Quadrupole als Massenfilter mit unterschiedlichen Parametern genutzt werden. Die Messung erfolgt im sogenannten Multiple Reaction Monitoring

(MRM)-Modus. Der erste Quadrupol wird dabei auf eine bestimmte Vorläuferionen-Masse eingestellt, welche anschließend in der Kollisionskammer fragmentiert wird. Der zweite Quadrupol wird so eingestellt, dass nur bestimmte Massen von Fragmenten des spezifischen Vorläuferions ihn passieren und zum Detektor gelangen können. Dies bezeichnet man als Übergang. Durch die Auswahl mehrerer Übergänge kann man so aus einer komplexen Probe mit hoher Selektivität gewünschte Analyten detektieren.

Während diese MS-Methoden kombiniert mit Flüssigkeitschromatografie für diverse Analyten seit längerem weit verbreitet sind, hat sich die Kombination aus Gaschromatografie und Triple Quad MS bisher vor allem bei der Pestizidanalytik durchgesetzt.

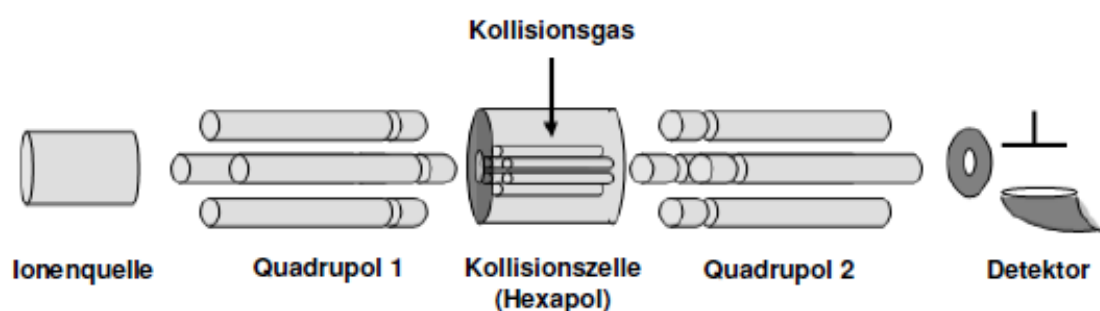


Abbildung 5 Modell eines Triple Quadrupol Massenspektrometers (Agilent, 2009)

Der verwendete Gaschromatograf ist mit einem Backflush-Ventil ausgestattet. Die GC-Säule ist in der Mitte geteilt; durch die Verwendung eines EPC-Moduls (elektronischer Druckregler, Electronic Pneumatic Control) werden unerwünschte Komponenten nach Elution der Analyten durch Umkehr des Säulenflusses aus dem System gespült. Dadurch können Laufzeiten verkürzt sowie Säule und Detektor geschont werden. Das verwendete GC-MS/MS-Gerät ist in Anhang 6.6.5 beschrieben. Die geräteparametrischen Basiseinstellungen sind in Anhang 6.7.2 aufgeführt. Die ausgewählten Übergänge sind in Abschnitt 4.1.2 aufgeführt.

### 3.3 Direkte Messung von GE mittels LC-MS

Der direkte Nachweis der GE erfolgte mittels LC-MS durch chemische Ionisation unter Atmosphärendruck (APCI). Hierfür wurde eine in Japan entwickelte, inzwischen mehrfach modifizierte Analysenmethode verwendet (Shiro *et al.* 2011b). Die Methode wurde im Rahmen einer Methodenvergleichsstudie von verschiedenen Laboren getestet (Blumhorst *et al.* 2012)

und ist mittlerweile als offizielle AOCS Methode publiziert (Joint AOCS/JOCS Official Method Cd 28-10). Im Folgenden wird sie als „Methode C“ bezeichnet.

Die ursprüngliche Methode ist für die Messung von fünf GE (Glycidyl-Palmitat, -Stearat, -Oleat, -Linoleat und -Linolenat) konzipiert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Methode für die Analyse von Glycidyl-Laurat und -Myristat sowie für vier interner Standards (deuterierte GE) erweitert. Diese sind Glycidyl-Oleat-d<sub>5</sub>, -Linolenat-d<sub>5</sub>, -Palmitat-d<sub>5</sub> und -Stearat-d<sub>5</sub>. Die Erweiterung um weitere GE war nicht möglich, da zum Zeitpunkt der Analyse keine weiteren Standardsubstanzen käuflich zu erwerben waren.

Das Prinzip der Methodenaufarbeitung ist Folgendes: Die Probe wird in t-BME/Ethylacetat gelöst und ein Aliquot in einem nicht-retardierenden Festphasenextraktions-Verfahren aufgereinigt. Mit Hilfe einer C18-SPE-Kartusche werden zunächst die im Fett enthaltenen Triglyceride entfernt, die durch ihre drei Acylgruppen hydrophober als die GE mit einer Acylgruppe sind. Anschließend werden mit Hilfe einer Silica-SPE-Kartusche die Mono- und Diglyceride von den GE separiert, da erstere mit einer bzw. zwei Hydroxygruppen hydrophiler als die GE sind. Das Eluat wird eingedampft, in Methanol/Isopropanol aufgenommen und mittels LC-MS gemessen. Die Messung erfolgt im einfachen MS-SIM-Modus. Es gibt bei diesem Verfahren jeweils nur ein Quantifizierungssion  $[M+H]^+$  und keine Qualifizierungssionen. Das detaillierte Verfahren zur Probenvorbereitung sowie die verwendeten LC-MS Parameter sind im Anhang 6.7 aufgeführt.

### **3.4 Proben zur Untersuchung von Humanmilch**

#### **3.4.1 Gewinnung der Probandinnen und Fallzahlabeschätzung**

Die Humanmilchproben stammen von Frauen aus dem Umfeld der Autorin. Dies sind neben Wissenschaftlerinnen des Bundesinstituts für Risikobewertung Mütter aus Berlin, zu denen Kontakt über Mutter-Kind-Gruppen bzw. über eine Hebamme hergestellt werden konnte. Die Probensammlung erfolgte zwischen Juli 2008 und Dezember 2012.

Zwei Proben stammen aus einer älteren Studie, die von Herrn Prof. Gerhard Jahreis am Lehrstuhl für Ernährungsphysiologie durchgeführt wurde. Sie stammen aus dem Jahr 2003, als die Problematik der Glycidyl- und MCPD-Ester noch nicht in Deutschland bekannt war und die Belastung der Lebensmittel vermutlich höher war als in den letzten Jahren.

Nachdem sich bei den ersten Untersuchungsergebnissen zeigte, dass die Gehalte unter der Nachweisgrenze liegen, wurde in Bezug auf die Anzahl der zu untersuchenden Humanmilchproben nachfolgende Fallzahlabeschätzung gemacht: Die Frage war, wie viele Proben mit negativem Ergebnis untersucht werden müssen, um bei einer vorgegebenen Konfidenz

die Aussage treffen zu können, dass nur maximal ein bestimmter Prozentsatz der Bevölkerung dennoch messbare Konzentrationen aufweist. Für eine Konfidenz von 90 % und einen Anteil von 10 % der Bevölkerung mit messbaren Gehalten errechnete sich eine Fallzahl von 22 (Details der Rechnung finden sich im Anhang 6.1). Bei dieser Zahl von Proben mit negativem Ergebnis kann also mit einer Konfidenz von 90 % die Aussage getroffen werden, dass maximal 10 % der Bevölkerung dennoch messbare Konzentrationen aufweisen können.

### 3.4.2 Sammlung und Lagerung der Proben

Die Probandinnen wurden gebeten, 30 – 50 ml Milch abzupumpen bzw. auszustreichen und die Milch in einen Gefrierbeutel speziell für Muttermilch umzufüllen. Die Proben wurden sowohl im Haushalt der Mutter als auch im BfR bis zum Zeitpunkt der Analyse bei  $-18 \pm 3^\circ\text{C}$  tiefgefroren. Milch von Ziegen und Kühen wurde nach dem Melken in Kunststoffflaschen gefüllt und bis zur Analyse bei  $-18 \pm 3^\circ\text{C}$  gelagert.

### 3.4.3 Erhebungsinstrument Fragebogen

Zur Charakterisierung des Probandenkollektivs und um mögliche Expositionswege und Einflussparameter zu erfassen, wurde ein Fragebogen entwickelt. Um die Exposition der Mütter gegenüber mit MCPD-Estern belasteten Lebensmitteln wie Margarine, fetthaltigen pflanzlichen Brotaufstrichen oder Frittierfett abzuschätzen, wurden Angaben zur Häufigkeit des Verzehr dieser Lebensmittel über die letzten 10 Jahre erbeten. Weiterhin wurde gefragt, ob sich die Probandinnen vegetarisch oder vegan ernährten, wie oft sie außer Haus aßen (Betriebskantine, Restaurant, Imbiss), wie oft sie selbst kochten und welche Speiseöle sie beim Kochen verwendeten. Zudem wurden Informationen über das Alter der Mutter und des Kindes zum Zeitpunkt der Probennahme sowie über die Anzahl der bisher gestillten Kinder erbeten. Der Fragebogen ist als Anhang 6.3 beigelegt. Mit Ausnahme der Proben aus der Studie von 2003 (siehe 3.4.1) sind von allen Müttern ausgefüllte Fragebögen vorhanden (n=22).

### 3.4.4 Beschreibung der Milchproben

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten 42 Milchproben von 24 Frauen untersucht werden. Von 11 Frauen wurden mehrere Proben untersucht. Die Mütter wurden zwischen 1968 und 1982 geboren und waren zum Zeitpunkt der Milchabgabe zwischen 29 und 40 Jahre alt (Mittelwert 34,0 Jahre; Median 35,0 Jahre). Dabei konnten 9 Proben von 7 Frauen innerhalb des ersten Monats der Stillperiode gesammelt werden. Fünf Proben stammen aus dem zweiten Monat der Stillperiode, 7 Proben aus dem dritten Monat, 2 Proben aus dem vierten Mo-

nat, 3 Proben aus dem fünften Monat, 6 Proben aus dem sechsten Monat, 4 Proben aus dem siebten Monat und 1 Probe aus dem achten Monat der Stillperiode. Zwei Probandinnen hatten vor diesem Kind bereits zwei Kinder gestillt, 6 Frauen stillten zum Zeitpunkt der Untersuchung ihr zweites Kind, 13 Mütter waren Erstgebärende (keine Angaben von 3 Frauen).

Zudem wurde Milch von 7 Ziegen, die auf dem Versuchsgut des BfR in Berlin Marienfelde leben, untersucht. Bei den Ziegen handelt es sich um Deutsche Edelziegen, die gruppenweise in mit Stroh und Heu eingestreuten Tierställen bzw. im Außenlauf gehalten werden. Die Tiere haben jederzeit Zugang zu Frischwasser, während das Futter zwei Mal täglich vorgelegt wird. Gefüttert wird Maissilage, Hafer, Diffusionsschnitzel (Abfallprodukt aus der Zuckerrübenverarbeitung) und Mineralfutter. Vier Ziegen waren fünf Jahre alt und laktierten zum vierten Mal. Bei drei Ziegen waren Geburtsdatum und die Anzahl vorhergehender Laktationen unbekannt. Sie leben seit 2006 auf dem Versuchsgut, eine der drei Ziegen laktierte bei Probennahme seit der Aufnahme im BfR zum vierten, eine zum fünften und eine zum sechsten Mal. Die Probenahme erfolgte zwischen dem 46. und 57. Tag der Laktation nach Geburt der jeweiligen Lämmer. Unbehandelte Kuh-Rohmilch, ebenfalls von Tieren des Versuchsgutes, wurde zur Erstellung von Matrixkalibrierungen verwendet.

### **3.5 Analytik Milchproben**

Zur Bestimmung von 2-MCPD- und 3-MCPD-Estern in Human- und Ziegenmilch wurde eine indirekte Analysenmethode entwickelt und validiert. Die Methode wird im Folgenden auch als „Methode A“ bezeichnet.

#### **3.5.1 Milchfettextraktion**

Die Milch wurde im Wasserbad aufgetaut und 5 g der Probe auf einer Analysenwaage in ein Reagenzglas mit Schraubverschluss eingewogen. Anschließend wurde mit einer Kolbenhubpipette interne Standardlösung hinzugegeben (0,3 µg d<sub>5</sub>-3-MPCD bzw. d<sub>5</sub>-2-MPCD absolut, eingesetzt als 1,2-Bis-palmitoyl-3-Chloropropanediol-d<sub>5</sub> bzw. 1,3-Distearoyl-2-chloropropanediol-d<sub>5</sub>) und durch kurzes Schütteln in der Probe verteilt. Es folgte die Zugabe von 0,5 ml einer gesättigten wässrigen Lösung an Dikaliumoxalat, 2,5 ml Ethanol und 5 ml eines Gemisches aus n-Hexan/Diethylether (1:1). Das Reagenzglas wurde verschlossen, 10 s mit Hilfe eines Vortex und dann 15 min in einem Überkopf-Schüttler geschüttelt. Nach Zentrifugation für 2 min bei 3000 g (10°C) wurde die obere organische Phase in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zugabe von 2,5 ml Ethanol und 4,5 ml des Gemisches aus n-Hexan/Diethylether (1:1) wurde die Extraktion einmal wiederholt. Zu den vereinigten organischen Extrakten wurden 1,3 ml Reinstwasser gegeben und das Reagenzglas 10 s mit einem Vortex geschüttelt. Die untere wässrige Phase wurde verworfen. Nach Zentrifugation

für 2 min bei 3000 g und 10 °C wurde die obere organische Phase in ein neues Reagenzglas überführt und die untere wässrige Phase ebenfalls verworfen. Die Reinigung des organischen Extrakts wurde noch zweimal wiederholt, um Salzreste zu entfernen. Anschließend wurde der organische Extrakt zur Trocknung mit einer Spatelspitze getrocknetem Natriumsulfat versetzt, mit einem Vortex 10 s geschüttelt und anschließend für 2 min bei 3000 g zentrifugiert. Die obere organische Phase wurde wiederum in ein neues Reagenzglas überführt und die Trocknung einmal wiederholt. Nach Entfernung des Lösungsmittels bei 40°C mit Hilfe einer automatischen Eindampfstation mit N<sub>2</sub>-Strom (ca. 4 Stunden) wurde der Milchfettgehalt gravimetrisch bestimmt.

### 3.5.2 Aufarbeitung des Fettextrakts

Das MilCHFett (i.d.R. 80 bis 150 mg) wurde in t-BME gelöst. Die Esterhydrolyse erfolgte alkalisch katalysiert durch Zugabe von 200 µl Natriummethylat-Lösung (in Methanol; 0,5 mol/l) für 9-10 min bei Raumtemperatur. Durch Zugabe von 600 µl angesäuerter wässriger Ammoniumsulfatlösung (37,7 % w/v Ammoniumsulfat, 25 %iger Schwefelsäure, 50:3 v/v) wurde die Reaktion abgestoppt. Anschließend wurden die Fettsäuremethylester durch Flüssig-Flüssig Extraktion mit 2 x 1 ml Isohexan aus der Probe entfernt.

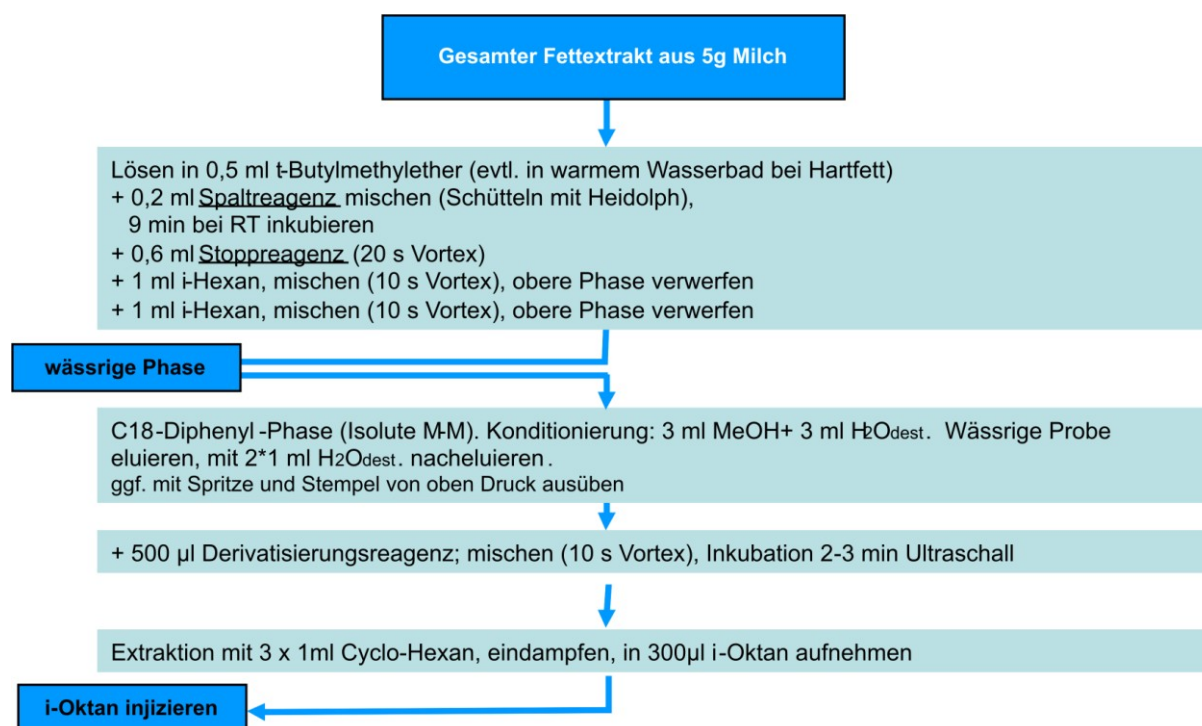


Abbildung 6 Schematische Darstellung der Aufarbeitung des Fettextrakts aus Milch

Der untere wässrige Extrakt, der das freie MCPD enthält, wurde im Anschluss mittels einem nicht-retardierenden Festphasenextraktions-Verfahren gereinigt (SPE, englisch: Solid Phase Extraction). Hierfür wurden SPE-Kartuschen der Firma biotage Multimode M-M verwendet

(vgl. Abbildung 12, Abschnitt 4.2.2). Die SPE-Kartuschen wurden zunächst mit Methanol und dann mit Reinstwasser konditioniert. Anschließend wurde der gesamte wässrige Probenextrakt auf die SPE-Säule aufgetragen und das Eluat aufgefangen. Zur möglichst vollständigen Elution wurde die SPE-Kartusche 2 x mit 1 ml Wasser nacheluiert. Anschließend wurde das Eluat mit Phenylboronsäure-Lösung in Aceton/Wasser (12,5 %, w/v in Aceton/Wasser, 19/1, v/v) versetzt. Die Derivatisierung erfolgte für 2-3 min im Ultraschallbad. Die Extraktion der Derivate erfolgte durch die dreimalige Zugabe von 1 ml Cyclohexan. Die oberen organischen Extrakte wurden vereinigt und das Lösungsmittel im N<sub>2</sub>-Strom vorsichtig zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde in 300 µl i-Oktan aufgenommen und in das GC-MS-System injiziert. Durch die Aufkonzentrierung des Hexan-Derivat-Endextraktes sowie die Umlösung in ein polareres Lösungsmittel konnten in einem weiteren Schritt störende Matrixbestandteile entfernt sowie die Nachweisgrenze verbessert werden. Eine schematische Darstellung der Aufarbeitung der flüssigen Milchproben zeigt Abbildung 6.

Tabelle 1 Konzentrationsstufen der Kalibrierreihe der Methode für Humanmilch

Dotierung Kuhmilch (5 g Milch)	Zugabe IS	Zugabe 2- und 3-MCPD-Ester	Konzentration 2- und 3-MCPD absolut im Probenansatz in µg	Konzentration 2- und 3-MCPD (mg/kg) bezogen auf circa 150 mg Fett*
Standard 0	45 µl d <sub>5</sub> -2-MCPD-Ester + 45 µl d <sub>5</sub> -3-MCPD-Ester (entspricht 0,45 µg d <sub>5</sub> -MCPD abs.)	<u>38 µl SV 3</u>	0,038	0,25
Standard 1		<u>75 µl SV 3</u>	0,075	0,50
Standard 2		<u>150 µl SV 3</u>	0,150	1,00
Standard 3		<u>30 µl SV 2</u>	0,300	2,00
Standard 4		<u>45 µl SV 2</u>	0,450	3,00
Standard 5		<u>60 µl SV 2</u>	0,600	4,00
Standard 6		<u>75 µl SV 2</u>	0,750	5,00
Standard 7		<u>90 µl SV 2</u>	0,900	6,00

\* die zur Dotierung verwendete Kuhmilch hatte einen Fettgehalt von 3,0 %

#### Konzentration SV 3 (in Ethylacetat)

5,31 µg/ml 1,2-Bis-palmitoyl-3-chloropropanediol

5,82 µg/ml 1,3-Distearoyl-2-chloropropanediol

#### Konzentration SV 2 (in Ethylacetat)

53,14 µg/ml 1,2-Bis-palmitoyl-3-chloropropanediol

58,21 µg/ml 1,3-Distearoyl-2-chloropropanediol

#### Konzentration IS (in Ethylacetat)

54,10 µg/ml 1,2-Bis-palmitoyl-3-chloropropanediol-d<sub>5</sub>

56,10 µg/ml 1,3-Distearoyl-2-chloropropanediol-d<sub>5</sub>

Von jeder Probe wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Für die Quantifizierung der Analyten wurden während jeder Probenaufarbeitung 5 g Kuhmilch eingewogen und damit Kalibrierstandards der Standardsubstanzen 1,2-Bis-palmitoyl-3-MCPD-Ester und 1,3-



Distearoyl-2-chloropropanediol in acht Konzentrationsstufen hergestellt. Die einzelnen Konzentrationsstufen sind Tabelle 1 zu entnehmen.

### 3.5.3 GC-MS-Messung der flüssigen Milchproben

Das verwendete GC-MS-System ist in Anhang 6.6.5 beschrieben. Geräteparameter sowie die ausgewählten Fragmentationen und zugehörigen Strukturformeln sind in Anhang 6.7.3 dargestellt. Dort ist auch die GC-MS-Auswertung beschrieben.

## 3.6 Proben zur Untersuchung von Säuglingsmilchnahrung

Um die aktuelle Exposition nicht-gestillter Säuglinge gegenüber 3-MCPD-Estern, 2-MCPD-Estern und GE zu untersuchen, wurden zwischen Januar und März 2013 70 Säuglingsanfangsnahrungen im Berliner Handel gekauft. Ausschließlich wurden dabei Pre- und 1-Nahrung bezogen, die für sich allein den Ernährungserfordernissen des Säuglings bis zur Einführung von Beikost entsprechen sollen. Von sieben Handelsmarken wurden jeweils fünf verschiedene Chargennummern der Pre- und 1-Nahrung untersucht (vgl. Tabelle 2). Zwei Handelsmarken sind Eigenmarken von Drogeriemarktketten. Produkt A, B, C, D und E wurden bei derselben Drogeriemarktkette bezogen, um standardisierte Preisangaben machen zu können. Produkt F und G wurden bei einer weiteren Drogeriemarktkette gekauft.

Tabelle 2 Hersteller und Preise der untersuchten Säuglingsmilchnahrungen

Handelsmarke	Hersteller	Preis in € pro kg Milchpulver	
		Pre-Nahrung	1-Nahrung
Produkt A	Hersteller 1	11,25	10,75
Produkt B	Hersteller 1	13,31	13,31
Produkt C	Hersteller 2	12,42	12,42
Produkt D	Hersteller 3	12,44	12,44
Produkt E	Eigenmarke Drogeriemarkt 1	6,58	6,58
Produkt F	Eigenmarke Drogeriemarkt 2	6,65	6,65
Produkt G	Hersteller 1	9,92	7,06

Die Handelsmarken unterscheiden sich bezüglich des Preises (Tabelle 2). Bei Produkt A, B und G handelt es sich um Handelsmarken unterschiedlicher Preisklassen, die vom selben Hersteller produziert werden. Bei den Handelsmarken B, C, D, E und F gibt es keine Unter-

schiede bezüglich des Preises zwischen Pre- und 1-Nahrung. Die Proben wurden bis zur Analyse bei Raumtemperatur gelagert.

### **3.7 Analytik Säuglingsmilchnahrung**

Die Methode zur Bestimmung zur Analyse von Säuglingsmilchnahrung wird im Folgenden als „Methode B“ bezeichnet.

#### **3.7.1 Fettextraktion mittels beschleunigter Lösemittlextraktion**

Die Fettextraktion aus Säuglingsmilchnahrung erfolgte mittels beschleunigter Lösungsmittel-extraktion (ASE, englisch: Accelerated Solvent Extraction). Das Prinzip dieser automatisierten Extraktionsmethode beruht darauf, dass durch erhöhte Temperatur und Druck in Kombination mit Lösemitteln die Effizienz des Extraktionsprozesses gesteigert werden kann. Folge davon sind kürzere Extraktionszeiten und ein deutlich geringerer Lösemittelverbrauch. Bei erhöhten Temperaturen wird die Extraktionskinetik stark beschleunigt, die Desorption der Analyten von der Matrix verläuft wesentlich schneller als bei Raumtemperatur. Die Probe wird hierfür mit einem Dispersionsmittel vermischt. Dies hat den Vorteil, dass die Oberfläche vergrößert wird und eine vollständige Benetzung der Probe mit dem Extraktionsmittel gewährleistet wird. Das Gemisch wird in eine druckstabile, beheizbare Extraktionszelle gefüllt, welche vom ASE-Extraktor in den Ofen eingeführt und mit Lösungsmittel befüllt wird. Während des Aufheizens wird der vorgegebene Druck konstant gehalten. Für 5 – 10 min wird die Probe dem heißen Lösemittel ausgesetzt (statische Extraktion), dann spült das ASE-Gerät mit einer definierten Menge an kaltem Lösemittel die Extraktionslösung in die Auffanggefäße. Es sind mehrere Extraktionszyklen pro Probe möglich. Für diese Extraktionstechnik bieten sich insbesondere feste, pulverförmige Proben an.

Für die ASE von Säuglingsmilchpulvers wurden zwei Gramm Probe mit 4,6 g Dispersionsmittel Isolute HM-N und 800 µl Reinstwasser in einem Becherglas verrührt und in eine 22 ml-Extraktionsszelle gefüllt. Die Methodenparameter sind in Tabelle 3 aufgeführt. Nach der Extraktion wurden die Auffanggefäße mit dem Extrakt für 4 Stunden in eine automatische Eindampfstation mit N<sub>2</sub>-Strom gestellt und der Fettgehalt gravimetrisch durch Rückwaage bestimmt.

Tabelle 3 Methodenparameter für die beschleunigte Lösemittlextraktion von Säuglingsmilchnahrung

Lösungsmittel	Isohexan / Aceton (80:20; v/v)
Temperatur	100°C
Druck	103,4 bar
Heizzeit	6 min
Ruhezeit	5 min
Spülvolumen	100 %
Spülzeit	60 s
Anzahl Extraktionszyklen	3

### 3.7.2 Aufarbeitung des Fettextrakts

Die indirekte Bestimmung von estergebundenem 2-MCPD, 3-MCPD und Glycidol erfolgte nach einer Methode von Unilever R&D Vlaardingen (Ermacora und Hrnčirik 2012). Die Methode wurde für die Analyse von Speisefetten und Ölen entwickelt und publiziert. Eine schematische Übersicht der Probenaufarbeitung mit genauer Zusammensetzung der verwendeten Lösungen ist in Abbildung 7 aufgeführt. Für die Kalibrierung wurden Kalibrierlösungen hergestellt. Die einzelnen Konzentrationsstufen sind Tabelle 4 zu entnehmen. Diese Kalibrierstandards wurden parallel mit den Proben aufgearbeitet.

Die Aufarbeitung des extrahierten Fettes lässt sich in drei prinzipielle Schritte teilen: In einem ersten Schritt erfolgte die Umwandlung der GE in 3-MonoBromPropanDiol-Monoester (3-MBPD-Ester). Dies wurde durch Behandlung mit einer angesäuerten Natrium-Bromid-Lösung für 15 min bei 50°C durch nukleophile Öffnung der Epoxidstruktur der Glycidylester erreicht. Die organische Phase, die das Fett enthält, wurde dann mit Heptan extrahiert, das Lösungsmittel verdampft und in Tetrahydrofuran gelöst.

In einem zweiten Schritt erfolgte die Säure-katalysierte Spaltung der Esterbindungen durch Zugabe einer Lösung aus Schwefelsäure und Methanol (1,8 %, v/v) und Inkubation der Proben und Standards für 16 Stunden bei 40°C, wodurch 2-MCPD, 3-MCPD und 3-MBPD freigesetzt wurden. Durch Zugabe einer gesättigten wässrigen Lösung  $\text{NaHCO}_3$  wurde die Reaktion abgestoppt. Zur Steigerung der Empfindlichkeit der Methode bewährte sich die Reduzierung des Probenvolumens auf 1 ml durch Abdampfen der organischen Phase. Nach Zugabe einer wässrigen Natriumsulfatlösung wurden die Fettsäuremethylester durch Extraktion der Probe mit Heptan entfernt.

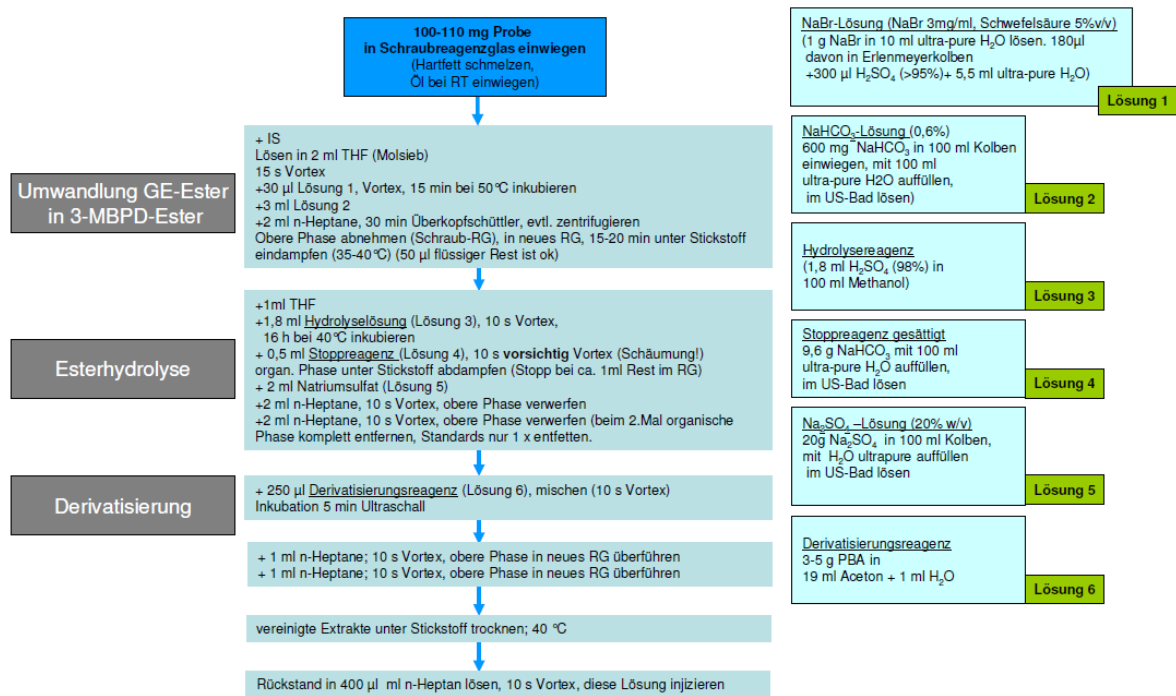


Abbildung 7 Schematische Darstellung der Aufarbeitung des extrahierten Milchfetts aus Säuglingsmilchnahrung (Säure-katalysierte Esterhydrolyse).

Abschließend erfolgte die Derivatisierung der Analyten mit gesättigter Phenylboronsäure-Lösung (12,5 % w/v in Aceton/Wasser, 19/1, v/v) bei Raumtemperatur im Ultraschallbad. Die Phenylboronsäure-Derivate wurden mit Heptan extrahiert, eingedampft, in 400 µl Heptan aufgenommen und mit GC-MS analysiert.

Tabelle 4 Konzentrationsstufen der Kalibrierreihe der Methode für Säuglingsmilch

		<b>2-MCPD-Ester (1,3-Distearoyl-2-chloropropanediol) in µg abs.</b>	<b>3-MCPD-Ester (1,2-Bis-palmitoyl-3-chloropropanediol) in µg abs.</b>	<b>2-MCPD/ 3-MCPD (µg abs.)</b>	<b>GE (µg abs.)</b>	<b>Glycidol (µg abs.)</b>	<b>IS</b>
Standard 0	-	0	0	<b>0</b>	0	<b>0</b>	60 µl IS-Mix (0,3 µg d <sub>5</sub> -MCPD abs. + 0,45µg d <sub>5</sub> -Glycidol abs.)
Standard 1	10µl Mix II	0,06	0,05	<b>0,01</b>	0,07	<b>0,02</b>	
Standard 2	25µl Mix II	0,15	0,13	<b>0,025</b>	0,17	<b>0,04</b>	
Standard 3	50µl Mix II	0,29	0,27	<b>0,05</b>	0,34	<b>0,08</b>	
Standard 4	100µl MixII	0,58	0,53	<b>0,1</b>	0,69	<b>0,15</b>	
Standard 5	20µl MixI	1,16	1,06	<b>0,2</b>	1,37	<b>0,30</b>	
Standard 6	30µl MixI	1,75	1,59	<b>0,3</b>	2,06	<b>0,45</b>	
Standard 7	40µl MixI	2,33	2,13	<b>0,4</b>	2,74	<b>0,60</b>	
Standard 8	50µl MixI	2,91	2,66	<b>0,5</b>	3,43	<b>0,75</b>	
Standard 9	60µl MixI	3,49	3,19	<b>0,6</b>	4,11	<b>0,90</b>	

<b>Konzentration IS-Mix</b>	
25,63 µg/ml	1,2-Bis-palmitoyl-3-chloropropanediol-d <sub>5</sub>
28,06 µg/ml	1,3-Distearoyl-2-chloropropanediol-d <sub>5</sub>
21,72 µg/ml	Glycidyl-Oleat-d <sub>5</sub>
<b>Konzentration Mix I</b>	
53,14 µg/ml	1,2-Bis-palmitoyl-3-chloropropanediol
58,21 µg/ml	1,3-Distearoyl-2-chloropropanediol
68,54 µg/ml	Glycidyl-Oleat
<b>Konzentration Mix II</b>	
5,31 µg/ml	1,2-Bis-palmitoyl-3-chloropropanediol
5,82 µg/ml	1,3-Distearoyl-2-chloropropanediol
6,85 µg/ml	Glycidyl-Oleat

### 3.7.3 GC-MS-Messung Säuglingsmilch

Das verwendete GC-MS-System ist in Anhang 6.6.5 beschrieben. Geräteparameter sowie die ausgewählte Fragmentationen und zugehörige Strukturformeln sind in Anhang 6.7.4 dargestellt. Dort ist auch die GC-MS-Auswertung beschrieben.

## **3.8 Berechnung zum Vergleich von direkten und indirekten Analysenmethoden**

Um die Ergebnisse der direkten Bestimmung der einzelnen GE mit den Ergebnissen der indirekten Analysenmethoden vergleichen zu können, wurde der Gehalt eines jeden GE als Glycidol-Äquivalent berechnet und summiert. Die Einzelergebnisse der sieben GE wurden durch das jeweilige Molekulargewicht der Ester geteilt, mit dem Molekulargewicht von Glycidol multipliziert und dann die Summe des in der Probe enthaltenen Glycidols gebildet. Werte unterhalb der jeweiligen Bestimmungsgrenze wurden mit dem halben Wert der Bestimmungsgrenze einbezogen, Werte unterhalb der Nachweisgrenze wurden nicht berücksichtigt.

## **3.9 Statistische Berechnungen**

Die Analysen der Human- und Ziegenmilchproben erfolgten im Dreifachansatz, die Säuglingsmilchnahrung wurde im Doppelansatz untersucht. Die Analysen wurden wiederholt, wenn der Variationskoeffizient bei der Analyse der Säuglingsmilchnahrung über 10 % lag. Statistische Berechnungen wurden mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel 2003 (Microsoft) und mit SPSS 12.01 für Windows (IBM, Armonk, USA) durchgeführt. Unabhängige Stichproben ( $n > 2$ ) wurden mit Hilfe der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) ausgewertet. Paarweise Gruppenvergleiche erfolgten mittels t-Test nach Student (2-seitig, Annahme gleicher Varianzen).

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Methodenvergleich zur Bestimmung von GE

Mit Bekanntwerden des Vorkommens von GE in raffinierten Pflanzenfetten im Jahr 2008 wurden verschiedene Analysenmethoden mit unterschiedlichen analytischen Ansätzen entwickelt. Derzeit werden direkte und indirekte Methoden zur Quantifizierung angewendet.

#### 4.1.1 Voruntersuchungen zum indirekten Nachweis

Glycidol kann nach der Esterhydrolyse nicht direkt bestimmt werden, sondern muss wegen der hohen Reaktivität in einen stabileren Analyten umgewandelt werden. Die Herausforderung besteht darin, das in der Probe enthaltene gebundene Glycidol nach der Hydrolyse der Ester quantitativ in einen spezifischen Analyten umzuwandeln und diesen Transformationsvorgang zu kontrollieren. Je nach verwendetem Salz wird Glycidol zu 3-MCPD oder 3-MBPD transformiert (vgl. Abschnitt 2.4.1). Da die meisten Proben mit 3-MCPD und 2-MCPD belastet sind, muss das aus Glycidol entstandene Transformationsprodukt von den in der Probe ebenfalls vorkommenden MCPD-Isomeren unterschieden werden können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Verhalten von GE unter den Bedingungen der DGF-Einheitmethode C-VI 18(10) getestet (DGF 2010). Das Prinzip der Methode ist in Abschnitt 3.1.2 erläutert. Eventuelle Unterschiede in der Transformation verschiedener GE, deren Fettsäurereste sich in der Kettenlänge bzw. dem Sättigungsgrad unterscheiden, wurde unter den in Ansatz A der DGF-Einheitmethode C-VI 18 (10) beschriebenen Methodenbedingungen getestet, da diese Ergebnisse dazu verwendet werden, den Gehalt an GE in der Probe zu quantifizieren: Neben Glycidyl-Stearat (GE C18:0) wurden Glycidyl-Linolenat (GE C18:3) und Glycidyl-Oleat (GE C18:1) verwendet, um ein unbelastetes Leinöl zu dotieren. Unraffiniertes Leinöl wurde mit verschiedenen Konzentrationen im Bereich von 1 bis 8 mg/kg an Glycidol (eingesetzt als GE) dotiert und nach Ansatz A parallel aufgearbeitet. Die Verwendung unterschiedlicher GE ergab trotz äquimolarer Anpassung des Glycidolanteils ungleiche 3-MCPD-Gehalte. Die Steigungen der Kalibriergeraden unterschieden sich deutlich und ergaben Transformationsfaktoren (TF) von 0,85 für Glycidyl-Stearat, 0,67 für Glycidyl-Linolenat und 0,71 für Glycidyl-Oleat. In Abbildung 8 ist die Ermittlung des TF durch die Dotierung von unraffiniertem Leinöl mit Glycidyl-Stearat abgebildet. Würde sich das zugegebene Glycidol vollständig in 3-MCPD umwandeln, ergäbe sich stöchiometrisch ein TF von 0,67. Ein TF größer als 0,67 bedeutet, dass sich das dotierte Glycidol nicht vollständig in 3-MCPD umwandelt. Die unterschiedlichen TF für verschiedene GE deuten daraufhin, dass auch die

Fettsäure, mit der das Glycidol verestert ist, einen Einfluss auf die Umwandlung hat. In Tabelle 5 wird dargestellt, dass sich das Ergebnis der verschiedenen TF auf den berechneten Glycidol-Gehalt auswirkt. Bei den Proben handelt es sich um ein mit Diglyceriden angereichertes japanisches Speiseöl, dass als „Econa-oil“ mit gesundheitsfördernden Eigenschaften vermarktet wurde, sowie um raffiniertes Palmfett, das im deutschen Einzelhandel als Frittierfett erworben wurde.

Neben 3-MCPD stieg auch der Gehalt von 2-MCPD linear an (vgl. Abbildung 8). Demnach wird Glycidol nach der Esterhydrolyse nicht zu 100 % zu 3-MCPD transformiert, sondern teilweise entsteht auch 2-MCPD. Dies wurde auch bei Glycidyl-Oleat und Glycidyl-Linolenat beobachtet.

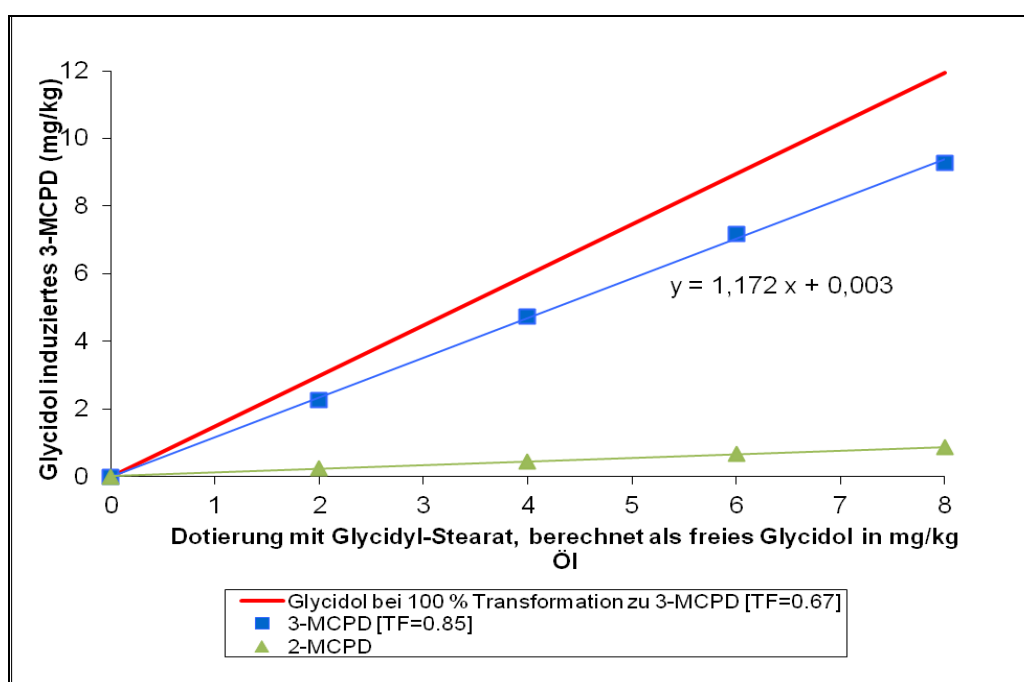


Abbildung 8 Umwandlung des Zwischenprodukts Glycidol in 3-MCPD bei Verwendung von Glycidyl-Stearat. Blankmatrix: Leinöl.

Um den Einfluss der Ölmatrix auf die Glycidoltransformation zu testen, wurden unbelastetes Leinöl, unbelastetes Sesamöl sowie das Diglycerid-reiche Speiseöl, in dem kein gebundenes MCPD nachweisbar ist, mit Glycidyl-Stearat dotiert, nach DGF-Einheitmethode C-VI 18 (10) aufgearbeitet und die TF berechnet. Für Leinöl wurde ein TF von 0,82, für Sesamöl ein TF von 0,86 und für das Diglycerid-reiche Öl ein TF von 0,76 ermittelt. Das bedeutet, dass die Transformation des GE sich in verschiedenen Matrices unterscheidet. Für die Berechnung des TF ist somit auch entscheidend, welche Blankmatrix verwendet wird.



Tabelle 5 Vergleich von Analysenergebnissen von zwei Proben bei Anwendung unterschiedlicher TF zur Quantifizierung des Glycidols.

GE	Probe I (Frittierfett)			Probe II (Econoail)		
	3-MCPD Ansatz A (mg/kg)	3-MCPD Ansatz B (mg/kg)	Berechneter Glycidol-Gehalt (mg/kg)	3-MCPD Ansatz A (mg/kg)	3-MCPD Ansatz B (mg/kg)	Berechneter Glycidol-Gehalt (mg/kg)
Glycidyl-Stearat TF=0,85	6,42	3,03	2,89	14,10	9,97	3,53
Glycidyl-Linolenat TF=0,67			2,27			2,77
Glycidyl-Oleat TF=0,71			2,41			2,94

#### 4.1.2 Untersuchungen zum direkten Nachweis

Mit der von AOCS validierten LC-APCI-MS-Analysenmethode (AOCS 2012) zur direkten Bestimmung der GE (Methode C) werden pro Analyt nur ein Quantifizierungsion und keine spezifischen Übergänge gemessen. Mit dieser Methode traten Störungen insbesondere bei Glycidyl-Oleat ( $m/z$  339,2) auf, ein zeitgleich eluierender Peak beeinträchtigte die Integration des Analyten. Bei der Suche nach der Ursache zeigte sich, dass dieser Störpeak reduziert werden kann, wenn zur Reinigung des verwendeten Glasgeschirrs tensidfreie Reiniger genutzt werden. Zusätzlich ist es notwendig, das Geschirr vor Gebrauch bei  $>300^{\circ}\text{C}$  über Nacht auszuheizen. In Abbildung 9 ist das Chromatogramm einer Ölprobe zu sehen.

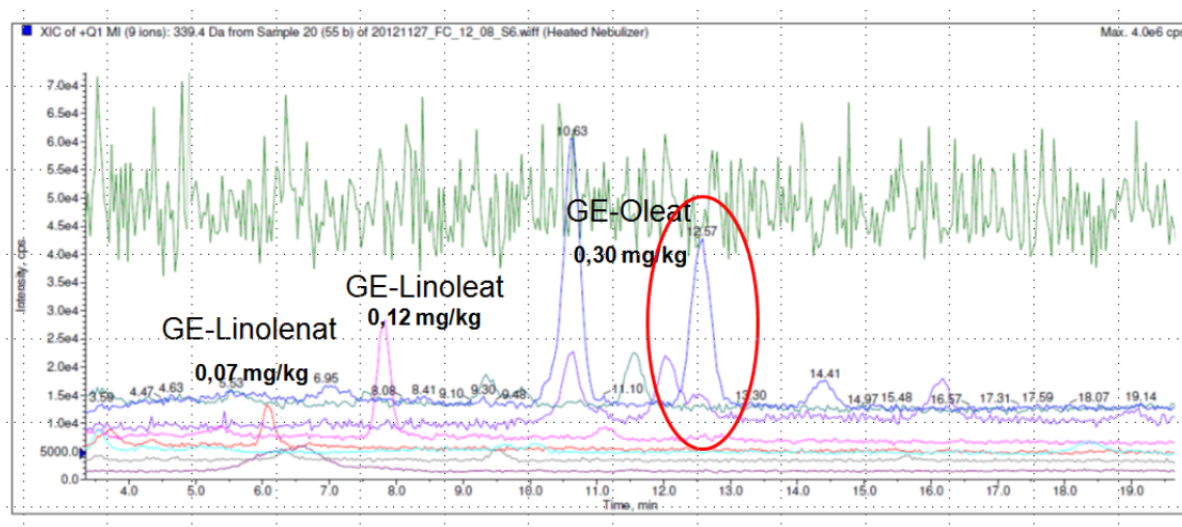


Abbildung 9 Interferenzen bei der Chromatografie von Glycidyl-Oleat in einer Ölprobe. RT Oleat bei 10,63 min, roter Kreis: Verunreinigung

Eine Anmerkung in der Analysenvorschrift (AOCS 2012), dass für die Vorbereitung der Proben und Standardlösungen nur Glasgeschirr verwendet werden darf, da Plastik-Verbrauchsmaterialien wie Pipettenspitzen oder SPE-Zubehörteile die Chromatografie der Analyten stören, konnte nicht bestätigt werden. Durch die von AOCS vorgeschlagene Veränderung der Polarität des Eluenten durch Zugabe von 8 % Wasser in Eluent A, der vorher aus 100 % Methanol bestand, verlängerte sich zwar die Analysenzeit um 10 Minuten. Dadurch konnte jedoch GE-Oleat chromatografisch vom Störsignal abgetrennt werden. Vollständig vermeiden ließ sich die Verunreinigung nicht.

#### Untersuchungen zur Anwendung eines markierten internen Standards für die Kontrolle der Wiederfindung der LC-APCI-MS-Methode

Folgt man der Methodenvorschrift von AOCS (2012), so wird keine Wiederfindungskorrektur vorgenommen. Die umfangreichen Probenaufarbeitungsschritte mit zwei SPE-Kartuschen legen jedoch nahe, dass es hierbei zu einem bedeutenden Verlust der Analyten kommen kann. Zur Beurteilung der Wiederfindung sind geeignete interne Standards erforderlich.

Tabelle 6 Ermittlung der Wiederfindungsraten mit und ohne IS bei Dotierung von unbelastetem Leinöl sowie Vergleich verschiedener IS. Dotierung mit einem Mix aus vier GE (je 10 mg/kg)

	Externe Kalibrierung	Interne Kalibrierung			
	Ohne IS	Glycidyl Palmitat-d <sub>5</sub>	Glycidyl Stearat-d <sub>5</sub>	Glycidyl Oleat-d <sub>5</sub>	Glycidyl Linolenat-d <sub>5</sub>
Glycidyl-Palmitat (mg/kg) (WFR %)	7,63 (76 %)	<b>9,00</b> (90 %)	9,28 (93 %)	8,74 (87 %)	7,88 (79 %)
Glycidyl-Stearat (mg/kg) (WFR %)	7,97 (80 %)	9,04 (90 %)	<b>9,28</b> (93 %)	8,83 (88 %)	8,06 (81 %)
Glycidyl-Oleat (mg/kg) (WFR %)	8,15 (82 %)	9,57 (96 %)	9,87 (99 %)	<b>9,30</b> (93 %)	8,37 (84 %)
Glycidyl-Linolenat (mg/kg) (WFR %)	8,39 (84 %)	9,82 (98 %)	10,12 (101 %)	9,54 (95 %)	<b>8,59</b> (86 %)

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden deshalb vier verschiedene isotoopenmarkierte Standards getestet, um die Wiederfindung zu korrigieren. Unbelastetes Leinöl wurde mit einem Mix aus Glycidyl-Palmitat, -Stearat, -Oleat und -Linolenat dotiert (jeweils 10 mg/kg Öl). Der interne Standard wurde zusammen mit der Probe auf die erste SPE-Kartusche dotiert. Die Konzentration des IS entsprach ebenfalls 10 mg/kg Öl. In Tabelle 6 sind die Gehalte, die mittels externer (ohne IS) und interner Kalibrierung erzielt wurden, gegenüber gestellt. Die Gehalte, die mit den jeweils entsprechend zugehörigen IS erzielt wurden, sind fett markiert. Die ermittelten Wiederfindungsraten (WFR) der internen Kalibrierung sind jeweils höher als die Wiederfindungsraten, die mit der externen Kalibrierung erzielt wurden.

### Direkter Nachweis der GE mit GC-MS/MS

Aufgrund der mangelnden Spezifität bei der Messung mit dem LC-MS/MS-Gerät im Q1-Multiple-Ion mode wurde geprüft, ob eine empfindliche Detektion mit spezifischeren Techniken mit GC-MS/MS oder LC-MS/MS möglich ist. Für diese Versuche stand ein Gaschromatograph 7980A gekoppelt mit einem 7000B Triple Quad Massenspektrometer, beide von der Firma Agilent, zur Verfügung.

Vorversuche mit einem Single GC-MS ergaben, dass für GE-Standardsubstanzen eine gaschromatografische Trennung und massenspektrometrische Detektion im SIM-Modus möglich ist. Hierfür wurde eine polare Säule mit einer Polyethylenglykol-Belegung verwendet. Nach Auswahl mehrerer Fragmentationen für 8 GE anhand der Injektion von Standardsubstanzen wurde Blankmatrix dotiert und analog zu Methode C eine SPE-Probenaufreinigung durchgeführt. Eine Messung der GE in Matrix im SIM-Modus war jedoch nicht erfolgreich. Die in der Probe enthaltenen Mono-Glyceride sind den GE bezüglich Masse und chromatografischem Verhalten zu ähnlich und lassen sich trotz aufwändiger Probenaufreinigung nicht vollständig eliminieren. Problematisch waren zudem Rückstände der Matrix, die auf der polaren Säule verblieben, da diese nur bis 220°C geheizt werden kann.

Die Messung im MRM-Modus hat durch die Detektion substanzspezifischer Massenübergänge den Vorteil der erhöhten Selektivität und teilweise auch der erhöhten Sensitivität, welche wiederum verbunden sind mit einer höheren Spezifität. Mit der Backflush-Einheit des verwendeten GC-MS/MS besteht zusätzlich die Möglichkeit, den Einfluss der Matrix auf die Messung zu reduzieren. Die Messung wurde mit einer DB-5 Säule durchgeführt, da diese auf bis zu 400°C aufgeheizt werden kann. Von acht GE in Standardlösung wurden Full-Scan-Spektren über den Massenbereich von  $m/z$  50 bis 400 aufgenommen. Dabei war auffällig, dass das jeweilige Molekülion nicht sehr prominent ist (A, Abbildung 10). Vermutlich findet schon in der Quelle eine starke Fragmentierung statt. Eine Änderung der Quellenspannung von -70 eV über mehrere Stufen bis auf -12 eV war zur Reduktion der „In-source“-Fragmentierung nicht erfolgreich. Die meisten Produktionen entstehen durch die Fragmentierung der Fettsäurekette durch  $\text{CH}_2$ -Abspaltungen ( $m/z$ -Differenz von 14). Intensive Signale ergaben die Übergänge vom Molekülion auf  $m/z$  116 (B, Abbildung 10) und  $m/z$  129 (C, Abbildung 10). Bei Glycidyl-Oleat- $\text{d}_5$  ergab sich entsprechend  $m/z$  121 ( $116+5$ ) und  $m/z$  134. Bei den Fragmenten mit  $m/z$  116 bzw.  $m/z$  121 handelt es sich um Produkte der Mc-Lafferty-Umlagerung. Bei dem Übergang  $m/z$  129 handelt es sich um den Rest des Glycidolanteils des Moleküls mit entsprechender Abspaltung des jeweiligen Fettsäurerestes (Abbildung 10). Bei verschiedenen GE konnten auch Acyliumionen der Fettsäurekette als Produkte identifiziert werden. Das entspricht bei Glycidyl-Oleat  $m/z$  265 bzw.  $\text{C}_{18}\text{H}_{33}\text{O}^+$ .

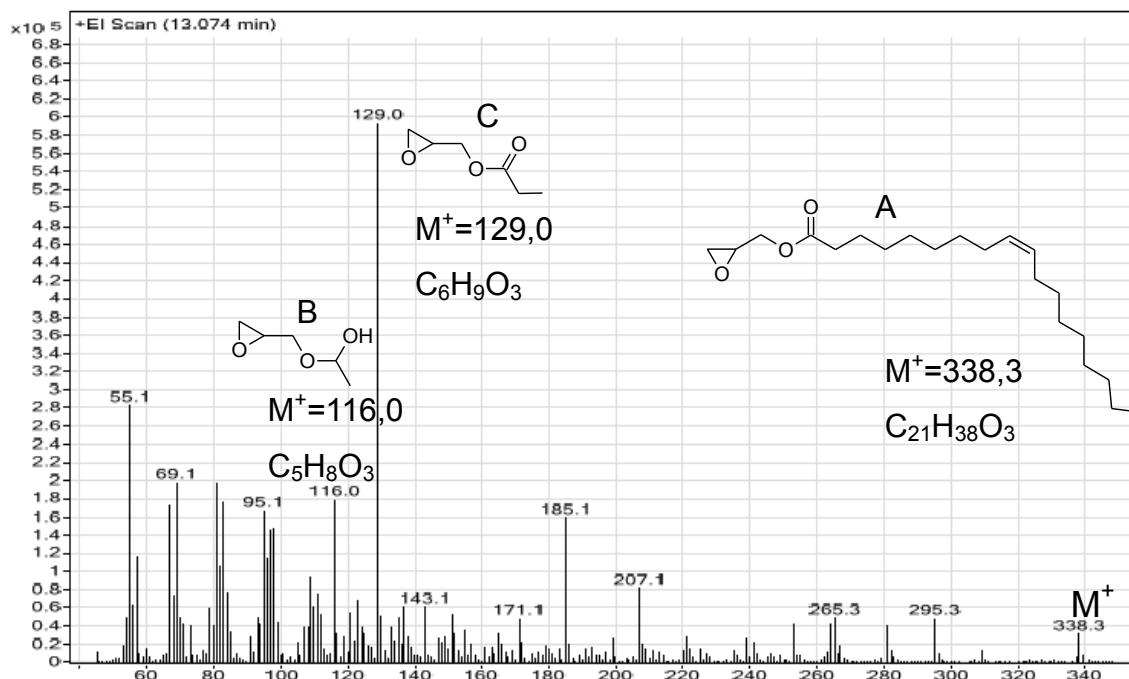


Abbildung 10 EI-GC-MS/MS Full-Scan-Spektrum von Glycidyl-Oleat ( $M^+ = m/z$  338,3). **A**, **B**: Fragmente durch McLafferty-Umlagerung. **C**: Glycidolfragment nach Abspaltung der Fettsäurekette

Da sich die GE strukturell nur durch die Kettenlänge der veresterten Fettsäure und durch die Anzahl der Doppelbindungen unterscheiden, ähneln sich die Fragmentierungsmuster stark. Produktionscans wurden für verschiedene Vorläuferionen jedes Analyten durchgeführt. Wie in Abbildung 10 (A) zu erkennen, ergibt das Ion  $M^+$  im Fullscan ein schwaches Signal im Vergleich zu den Fragmenten. Da erwartet wurde, dass sich im MRM-Modus ein besseres s/n-Verhältnis ergibt, wurde auch der Übergang  $M^+ > M^+$  aufgenommen. Nach der Auswahl der intensivsten Übergänge wurden die Kollisionsenergien für die einzelnen Fragmente optimiert.

Um beurteilen zu können, ob die für jeden GE optimierten MRM-Übergänge durch Matrixbestandteile oder durch andere GE gestört werden, wurden die Übergänge deshalb für jeden Analyten in getrennten MRM-Methoden zusammengestellt. Mit jeder Methode wurde jeder Analyt in Standardlösung und in aufbereiteter Matrix gemessen. Dabei ergab sich, dass die gewählten Übergänge nicht spezifisch waren, da teilweise auch bei der Messung anderer GE bei diesen Übergängen Signale auftraten. Dies war problematisch, wenn die chromatografische Trennung nicht möglich war. So wurde der Übergang 336>129 (Glycidyl-Linoleat) durch Glycidyl-Linolenat gestört, der Übergang 338>129 (Glycidyl-Oleat) wurde durch Glycidyl-Linoleat gestört. Diese Beobachtungen könnten darauf hinweisen, dass es während der Messung zur Hydrierung von Doppelbindungen mehrfach ungesättigter Fettsäuren kommt (z.B. im Einlasssystem des GC).

In Abbildung 11 wird ersichtlich, dass die chromatografische Trennung der Analyten mit einer DB-5 Säule nur anhand der Kettenlänge erfolgt. Alle GE mit 18 Kohlenstoffatomen eluieren unabhängig von der Anzahl der Doppelbindungen nahezu gleichzeitig von der GC-Säule.

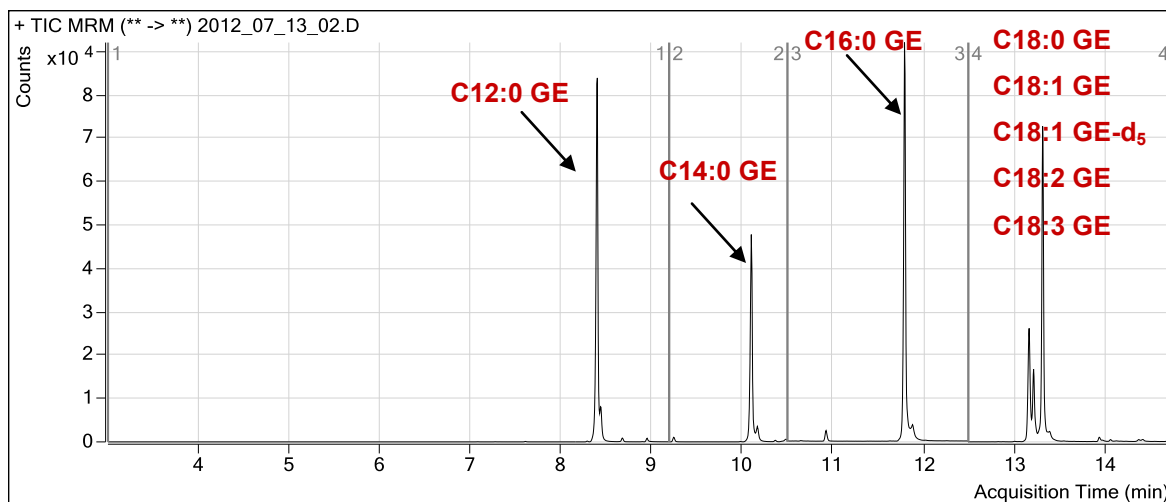


Abbildung 11 MRM-Chromatogram von 8 Glycidylfettsäureestern mittels GC-MS/MS unter Verwendung einer DB-5 Säule.

Im Vergleich zur sanfteren Ionisierung bei der Messung mit LC-APCI-MS/MS ist es bei GC-MS/MS unüblich, das Molekülion als Vorläuferion zu wählen. Wie in Tabelle 7 zu sehen, blieben für die Unterscheidung der ungesättigten C18-GE (Glycidyl-Oleat, -Linoleat, -Linolenat), mit Ausnahme des deuterierten Standards, nur die Übergänge ausgehend von den Molekülionen, da alle weiteren Übergänge durch die anderen Analyten bzw. durch Matrix gestört werden.

Tabelle 7 Ausgewählte Übergänge, Retentionszeiten und optimierte Kollisionsenergien für 9 Glycidylfettsäureester.

Analyt	RT	Vorläuferion	Fragment	Timesegment	Kollisionsenergie	Molekulargewicht
GE Laurat	8,4	213,1	143	TS 1	5	<b>256,38</b>
GE Laurat	8,4	213,1	139,2	TS 1	5	
GE Laurat	8,4	213,1	69	TS 1	15	
GE Myristat	10,103	199,1	125,1	TS 2	5	<b>284,43</b>
GE Myristat	10,103	241,2	167,2	TS 2	5	
GE Myristat	10,103	241,2	143	TS 2	5	
GE Palmitat	11,826	283,2	143	TS 3	0	<b>312,49</b>
GE Palmitat	11,826	283,2	69	TS 3	0	
GE Palmitat	11,826	269,2	269	TS 3	0	
GE Oleat-d <sub>5</sub>	13,164	272,3	67,1	TS 4	25	<b>343,56</b>
GE Oleat-d <sub>5</sub>	13,164	300,3	95	TS 4	15	
GE Oleat-d <sub>5</sub>	13,164	300,3	69	TS 4	25	
GE Linoleat	13,184	336,3	336,3	TS 4	0	<b>336,51</b>
GE Linoleat	13,184	336,3	129	TS 4	5	
GE Linoleat	13,184	336,3	79	TS 4	30	
GE Oleat	13,208	338,3	338,3	TS 4	0	<b>338,52</b>
GE Oleat	13,208	338,3	129	TS 4	10	
GE Oleat	13,208	295,3	81	TS 4	20	
GE Linolenat	13,241	334,2	90,8	TS 4	25	<b>334,49</b>
GE Linolenat	13,241	334,2	334,2	TS 4	0	
GE Linolenat	13,241	334,2	78,8	TS 4	25	
GE Stearat	13,321	297,2	143	TS 4	10	<b>340,54</b>
GE Stearat	13,321	297,2	97	TS 4	15	
GE Stearat	13,321	297,2	69	TS 4	20	

Die Messung von Standardlösungen im Bereich von 0 bis 25 µg/ml ergab, dass die Messung im Vergleich zu indirekten Methoden oder der einfachen LC-APCI-MS-Messung sehr unempfindlich ist. Die niedrigste Konzentration, die ein Signal mit akzeptablem Signal-Rausch-Verhältnis von 3 ergab, lag bei 250 ng/ml. Dies entspräche bei analoger Probenvorbereitung wie für die LC-APCI-MS-Messung einer Bestimmungsgrenze von etwa 25 mg/kg; diese ist damit deutlich höher als die Bestimmungsgrenze der LC-APCI-MS-Messung von etwa 40 µg/kg (Tabelle 29).

### Direkter Nachweis der GE mit LC-MS/MS

Für diese Versuche stand ein Triple-Quadrupol-Massenspektrometer 4000 QTrap der Firma AB Sciex zur Verfügung, das mit einer HPLC 1200 der Firma Agilent kombiniert ist.

Mit Hilfe einer Spritzenpumpe wurde zunächst GE-Standardlösung in das Massenspektrometer infundiert und der geeignete Ionisationsmodus sowie spezifische Vorläuferionen und Produktionen der Analyten ermittelt. Jeweils zwei Übergänge pro Analyt mit dem besten Signal-Rausch-Verhältnis wurden ausgewählt. Die Spannungsparameter für die Fragmentierung und Detektion der Produkt-Ionen speziell für das Gerät wurden automatisch optimiert und im Anschluss eine MRM-Methode erstellt. Die Ionisation unter Atmosphärendruck (APCI) erwies sich bei der Messung im MRM-Modus um den Faktor 100 empfindlicher im Vergleich zur Elektrosprayionisation (ESI).

Als Vorläuferion dienten jeweils die protonierten Molekülonen  $[M+H]^+$  der GE. Natriumaddukte lieferten intensive Signale, bildeten jedoch kaum charakteristische Fragmente. Kalium- oder Ammoniumaddukte konnten identifiziert werden, wiesen jedoch deutlich geringere Singalintensitäten auf als das protonierte Molekülion. Wie bei der Messung mit GC-MS/MS ergab sich, dass die GE keine charakteristischen Hauptfragmente für die Quantifizierung aufzeigen, da sie keine signalintensiven Produktionen bilden. Viele Fragmente resultieren auch hier aus der Fragmentierung der Fettsäureketten. Für jeden Analyten wurden dennoch jeweils drei Übergänge gemessen, u.a. vom Molekülion auf das unfragmentierte Molekülion  $[M+H]^+$  (Quantifier). Auswahlkriterium für die beiden weiteren Übergänge war eine möglichst hohe Fragmentmasse sowie ein möglichst hohes Signal-Rausch-Verhältnis. Übergänge mit niedrigem  $m/z$  gelten als unspezifisch bzw. störanfällig. Für Glycidyl Oleat wurde beispielsweise ausgewählt:  $339,2 > 339,2$ ;  $339,2 > 265,2$  und  $339,2 > 247,2$ .

Der Übergang von Molekülion auf Molekülion  $[M+H]^+$  ergab um den Faktor 20 höhere Signale als die signalintensivsten Übergänge auf charakteristische Fragmente. Der Test verschiedener Eluenten ergab, dass die Signalempfindlichkeit bei der Verwendung von Methanol im Vergleich zu Acetonitril verbessert werden konnte. Das ist auf die leichtere Protonenübertragung von Methanol zurückzuführen. Das verwendete LC-MS/MS-Gerät erlaubt eine minimale Kollisionsenergie von 5 EV, da eine Mindestspannung zur Beschleunigung der Ionen in den Q3 erforderlich ist. Dadurch ist eine Fragmentierung des Molekülions nicht zu vermeiden. Das heißt, dass das protonierte Molekülion im MRM-Mode immer teilweise fragmentiert, wenn im Q3 dasselbe  $m/z$  Verhältnis gemessen wird wie im Q1 und ein Teil der Signalintensität dadurch verloren geht.

Vergleichsmessungen dieser Methode mit der unter Abschnitt 3.3 beschriebenen LC-APCI-MS-Methode (Methode C) ergaben eine um den Faktor fünf niedrigere Empfindlichkeit. Für die Messung von Säuglingsmilchnahrung ist sie deshalb nicht geeignet.

## **4.2 Methodenentwicklung zur Bestimmung von 3-MCPD- und 2-MCPD-Fettsäureestern in Human- und Ziegenmilch**

Zur Analyse von Humanmilch bezüglich der Belastung von gebundenem MCPD muss in einem ersten Schritt das MilCHFett extrahiert werden, um dann nach Esterhydrolyse und Extraktion der Analyten die Belastung der Proben zu ermitteln.

### **4.2.1 Vergleich verschiedener Fettextraktionsmethoden**

Wegen des hohen Wassergehaltes wurde die Milch in ersten Versuchen für die Fettextraktion gefriergetrocknet und das Milchpulver mittels beschleunigter Lösungsmittelextraktion (ASE) extrahiert. Für die ASE wurden verschiedene Lösungsmittelgemische getestet. Mit einem Gemisch aus 60 % iso-Hexan, 25 % Methanol und 15 % Dichlormethan bei einer Extraktionstemperatur von 100°C und 3 Extraktionszyklen konnte die höchste Extraktionsausbeute bezogen auf das Fett erzielt werden. Mehrere Humanmilchproben wurden vereinigt und jeweils 100 g mit unterschiedlichen Konzentrationsstufen des 2-MCPD-Esters und 3-MCPD-Esters dotiert. Nach der Extraktion wurde der Fettgehalt gravimetrisch bestimmt und Wiederfindung und Präzision von gebundenem 2-MCPD und 3-MCPD bestimmt. Zur Quantifizierung diente eine Matrixkalibrierung desselben extrahierten Humanmilchfettes.

Die Ergebnisse des Fettes aus lyophilisierter Humanmilch für 3-MCPD und 2-MCPD waren nicht zufriedenstellend. Matrixbestandteile beeinträchtigten die Chromatografie, insbesondere die Ionenspuren  $m/z$  196 und  $m/z$  147, was die Integration der Analytsignale erschwerte. Die ermittelten Wiederfindungsraten lagen für gebundenes 2-MCPD zwischen 60 und 138 % und für gebundenes 3-MCPD zwischen 88 und 144 % und damit nicht im Zielbereich von 95-105 %; die Präzision, ausgedrückt durch die relative Standardabweichung, war mit bis zu 34 % für 3-MCPD bzw. 13 % für 2-MCPD zu hoch. Zudem war die erforderliche Gefrier-trocknung der Milch sehr zeitaufwendig.

Daraufhin wurden verschiedene Flüssig-Extraktionsverfahren mit Milch getestet: Neben dem von Zelinková *et al.* (2008) verwendeten Verfahren wurde das Verfahren nach Röse-Gottlieb (Matissek *et al.* 2010) – Extraktion nach Ammoniak-Auflschluss zur Bestimmung des Fettgehalts von Milch und Milcherzeugnissen – angewendet, sowie verschiedene Vereinfachungen der beiden Verfahren.



Für die Extraktion nach Röse-Gottlieb wurde die Probe mit Wasser, 25 %iger Ammoniaklösung und Ethanol versetzt, mit Diethylether und Petroleumbenzin zweimal extrahiert und das Lösungsmittel verdampft. Bei dem Verfahren nach Zelinková *et al.* (2008) wurde die Probe mit Dikaliumoxalat und Ethanol versetzt und mit einer Mischung aus Hexan/Diethylether (1:1, v/v) zweimal extrahiert. Der organische Extrakt wurde bei diesem Verfahren zusätzlich zweimal mit Wasser gereinigt und über Natriumsulfat getrocknet, bevor das Lösungsmittel verdampft wurde.

Die Fettausbeute war bei dem Verfahren nach Zelinková *et al.* (2008) 25 % höher als bei dem Verfahren nach Röse-Gottlieb. Die Handhabung war bei Zelinková *et al.* (2008) ebenfalls einfacher, da es zu einer klaren Phasentrennung zwischen organischer und wässriger Phase kam, während sich bei dem Verfahren nach Röse-Gottlieb bei diesem Schritt eine Interphase bildete.

Im Verfahren nach Zelinková *et al.* (2008) werden mit Ethanol die Proteine der Milch gefällt, während im Verfahren nach Röse-Gottlieb Ammoniak zugegeben wird, um die Proteine in der Milch aufzuschließen. Während der Versuche wurde deutlich, dass die Esterhydrolyse durch die Zugabe verschiedener Reagenzien beeinflusst werden kann - beispielsweise werden durch die pH-Wert Erhöhung mit Ammoniak die Ausgangsbedingungen für die Esterhydrolyse verändert.

Da die Methode von der tschechischen Forschungsgruppe verwendete Extraktionsmethode offensichtlich besser geeignet ist, wurde deshalb für die MilCHFettextraktion das von Zelinková *et al.* (2008) entwickelte Verfahren angewendet, allerdings in kleinerem Maßstab (vgl. 3.5.1). Auch der Einsatz von 5 statt 20 g Milch ergab noch eine ausreichende Fettausbeute.

Zelinková *et al.* (2008) verwendeten als internen Standard  $d_5$ -3-MCPD und gaben diesen erst vor der Derivatisierung zu. Inzwischen sind deuterierte 2- und 3-MCPD-Ester kommerziell erhältlich. Um den Verlust der Analyten über das gesamte Verfahren der Probenaufreinigung, insbesondere Fettextraktion und Esterhydrolyse, zu korrigieren, wurden die internen Standards zu Beginn des Verfahrens der flüssigen Milch zuzugeben.

#### 4.2.2 Extraktaufreinigung

Um die Analyten von störenden Matrixbestandteilen zu trennen, wurde ein Festphasenextraktions-Verfahren entwickelt. Nach Esterhydrolyse und Waschen der wässrigen Phase mit iso-Hexan, welches unerwünschte unpolare Probenanteile entfernt, befindet sich der Analyt in Form von freiem MCPD in der unteren wässrigen Phase. Diese wurde nun mit einem nicht retardierenden Extraktionsverfahren gereinigt. Störende Matrixbestandteile adsorbieren an der unpolaren Festphase. Als geeignet, beurteilt an der Signalintensität der Analyten, erwiesen sich SPE-Kartuschen der Firma Biotage Multimode M-M. Dabei handelt es sich um ein C18 – Diphenyl-Material mit Sulfonsäuregruppe und quartärer Aminogruppe (vgl. Abbildung 12).

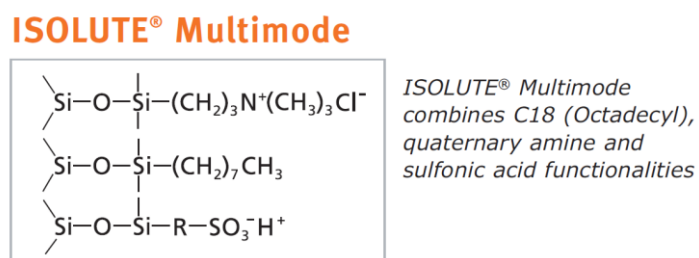


Abbildung 12 Isolute Multimode Material der verwendeten SPE Kartuschen zur Matrixabreicherung (Biotage, 2013)

Durch diese Extraktaufreinigung konnte die Belastung der GC-Säule sowie der Ionenquelle durch Matrixbestandteile, die insbesondere durch die Kombination mit dem Derivatisierungsmittel das GC-MS-System stark beanspruchen, deutlich reduziert werden. Zudem wurde die Präzision der Methode verbessert (vgl. Tabelle 23, Anhang 6.8.2). Die genaue Durchführung des Verfahrens ist Abschnitt 3.5 beschrieben.

#### 4.2.3 Untersuchungen zur geeigneten Kalibrierung

Grundvoraussetzung für quantitativ-analytische Messungen ist eine geeignete Kalibrierung. Mit einer Matrixkalibrierung werden im chromatografischen System für Standards ähnliche Bedingungen geschaffen wie bei den Realproben. Idealerweise wird eine Blank-Matrix dotiert, die den Realproben ähnelt und sich nur dadurch unterscheidet, dass sie den Analyten nicht enthält. Zunächst wurde eine Matrixkalibriergerade durch die Dotierung eines Blank-Leinöls mit 2- und 3-MCPD-Estern erstellt (interne Standards d<sub>5</sub>-2-MCPD- bzw. d<sub>5</sub>-3-MCPD-Ester). Diese Kalibriermethode zeigte sich aufgrund zu hoher Wiederfindungsraten (116-151 %) als ungeeignet. Wiederfindungsraten, die mittels Einpunktkalibrierung anhand des Verhältnisses von internem Standard und Analyt („Isotopen-Verdünnungsanalyse“) erzielt wurden, waren tendenziell zu niedrig (67-95 %). Die relative Standardabweichung für Mehr-

fachbestimmungen (n=3) lag zwischen 10 und 35 % für beide Verfahren und beide Analyten. Nachdem zunächst das Extraktionsverfahren optimiert wurde (vgl. Abschnitt 4.2.1), erwies sich eine Matrixkalibrierung mit unbehandelter Kuh-Rohmilch, als geeignet. Hiermit konnten zufriedenstellende Wiederfindungsraten erzielt werden (vgl. Abschnitt 6.8.2).

#### 4.2.4 Untersuchungen zum Einfluss der Fettextraktion

Um den Einfluss der Fettextraktion zu prüfen, wurde gebundenes MCPD auf eine Humanmilchprobe vor der Fettextraktion auf die flüssige Milch sowie nach der Extraktion auf das Fett dotiert. In der verwendeten Humanmilchprobe wurde zunächst ein Fettgehalt von 170 mg in 5 g Milch (3,4 %) ermittelt. Da nur 100 mg des extrahierten Fettes weiter verarbeitet wurden, wurde die Milch mit der 1,7-fachen Menge gespiked. Drei Proben wurden vor und drei Proben nach der Fettextraktion dotiert sowie drei Proben ohne Dotierung (nur IS) aufgearbeitet. Hierfür wurden jeweils 5 g Milch mit 0,51 µg gebundenem 2- und 3-MCPD und 2- und 3-MCPD-d<sub>5</sub> vor der Extraktion, bzw. 100 mg des extrahierten Fetts mit 0,30 µg der Analyten dotiert. In Tabelle 8 sind die Mittelwerte der ermittelten Konzentrationen aus der jeweiligen Dreifachbestimmung sowie die daraus bestimmten Wiederfindungsraten zusammengestellt.

Zur Beurteilung des Einflusses des Extraktionsschrittes wurde mittels ANOVA geprüft, ob sich die ermittelten Gehalte bei Dotierung vor und nach der Extraktion signifikant voneinander unterscheiden. Der Vergleich der ermittelten Prüfgröße F mit dem kritischen F-Wert ergab, dass die beiden Gruppen sich nicht signifikant unterscheiden und die Extraktion demnach keinen Einfluss auf das Analyseergebnis hat. In Tabelle 8 sind die berechneten Prüfgrößen für jeden Analyten angegeben.

Tabelle 8 Dotierung von Humanmilch vor und nach der Extraktion, ausgedrückt als freies MCPD in mg/kg Fett. Wiederfindungsraten und Ergebnisse der einfaktoriellen Varianzanalyse

		2-MCPD (mg/kg)	3-MCPD (mg/kg)
Dotierung vor der Extraktion (n=3)	Mittelwert ± SD (mg/kg)	2,87 ± 0,123	3,13 ± 0,238
	Dotierung (mg/kg)	3,00	3,00
	<b>Wiederfindung</b>	<b>95,7 %</b>	<b>104,5 %</b>
Dotierung nach der Extraktion (n=3)	Mittelwert (mg/kg)	2,89 ± 0,036	2,95 ± 0,122
	Dotierung (mg/kg)*	3,00	3,00
	<b>Wiederfindung</b>	<b>96,4 %</b>	<b>98,3 %</b>
<b>Prüfgröße F</b> (Kritischer F-Wert= 7,71)		<b>0,07</b>	<b>1,43</b>

\* Mittelwert Dotierung berechnet auf Probeneinwaage und Fettrückwaage

#### 4.2.5 Ermittlung der Extraktionsausbeute des Analyten

Um den Verlust der Analyten durch die Fettextraktion abzuschätzen, wurde eine Humanmilchprobe mit 2-MCPD- und 3-MCPD-Estern dotiert (0,04 mg/kg Milch). Der interne Standard wurde in Ansatz A direkt zur Milch gegeben und in Ansatz B auf das extrahierte MilCHFett. Für diesen Versuch wurde eine Matrixkalibrierung mit Kuhmilch verwendet, die Kalibrierstandards wurden auf das Kuhmilchfett **nach** der Extraktion zugegeben. Durch Vergleich der Ergebnisse aus Ansatz A und B bezogen auf Milch kann der Verlust von MCPD während der Extraktion berechnet werden.

Tabelle 9 Ermittlung der Extraktionsausbeute der Analyten. Vergleich der Ergebnisse bei Dotierung vor und nach der Extraktion von Milch.

	Endkonzentration 2-MCPD (mg/kg Milch)	MW ± SD (mg/kg)	Endkonzentration 3-MCPD (mg/kg Milch)	MW ± SD (mg/kg)
Ansatz A IS zu Milch zu- gegeben	0,043	0,043 ± 0,001 RSD: 2 %	0,070	0,069 ± 0,009 RSD: 13 %
	0,045		0,077	
	0,043		0,060	
	0,041		0,078	
	0,043		0,058	
Ansatz B IS zum MilCHFett zugegeben	0,033	0,032 ± 0,002 RSD: 6 %	0,035	0,035 ± 0,007 RSD: 20 %
	0,032		0,043	
	0,036		0,041	
	0,030		0,027	
	0,030		0,028	

Die Ergebnisse zeigen, dass der ermittelte 3-MCPD-Gehalt in Ansatz A im Mittel mit 0,069 mg/kg Milch etwa doppelt so hoch ist wie in Ansatz B mit 0,035 mg/kg Milch, so dass durch die Fettextraktion etwa die Hälfte des Analyten verloren geht. Bei 2-MCPD ist der Verlust durch die Fettextraktion mit 26 % niedriger (0,032 mg/kg in Ansatz B im Vergleich zu 0,043 mg/kg in Ansatz A). Die Extraktionsausbeute liegt demnach für beide Analyten bei etwa 50 %. Mit einer relativen Standardabweichung (RSD) von 6 % in Ansatz B ist die Reproduzierbarkeit der Extraktion für 2-MCPD besser als für 3-MCPD (20 %).

Die im Rahmen dieser Arbeit optimierte Methode zur Untersuchung der Human- und Ziegenmilch ist in Abschnitt 3.5 beschrieben und wird im Folgenden als Methode A bezeichnet. Zur Fettextraktion wurde das Verfahren nach (Zelinková *et al.*, 2008) in kleinerem Maßstab verwendet. Zur Freisetzung von 2- und 3-MCPD wurde eine alkalisch-katalysierte Esterhydrolyse durchgeführt. Der Probenextrakt wurde mit einem neu entwickelten SPE-Verfahren

zusätzlich aufgereinigt. Zudem wurde der Einfluss der Fettextraktion charakterisiert. Die Methode wurde hinsichtlich Präzision und Wiederfindung validiert und der lineare Arbeitsbereich sowie Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden bestimmt. Die Ergebnisse der Methodenvalidierung sind in Anhang (6.8.2) zusammengestellt.

### 4.3 Untersuchungsergebnisse der Humanmilchproben und Auswertung des Ernährungsfragebogens

Insgesamt wurden im Rahmen dieser Arbeit 42 Humanmilchproben von 24 Müttern untersucht. Der Fettgehalt der Proben variierte zwischen 0,99 und 5,45 %, der Mittelwert ( $\pm$  SD) betrug 2,64 ( $\pm$  1,10) %, der Medianwert 2,55 %.

Bei Verwendung der Methode A konnte in keiner der untersuchten Proben gebundenes 2-MCPD oder 3-MCPD nachgewiesen werden. Die Nachweisgrenze der Methode betrug für 2-MCPD-Ester 27  $\mu\text{g/kg}$  Milchfett, für 3-MCPD-Ester 63  $\mu\text{g/kg}$  Milchfett (vgl. Absatz 6.8.2).

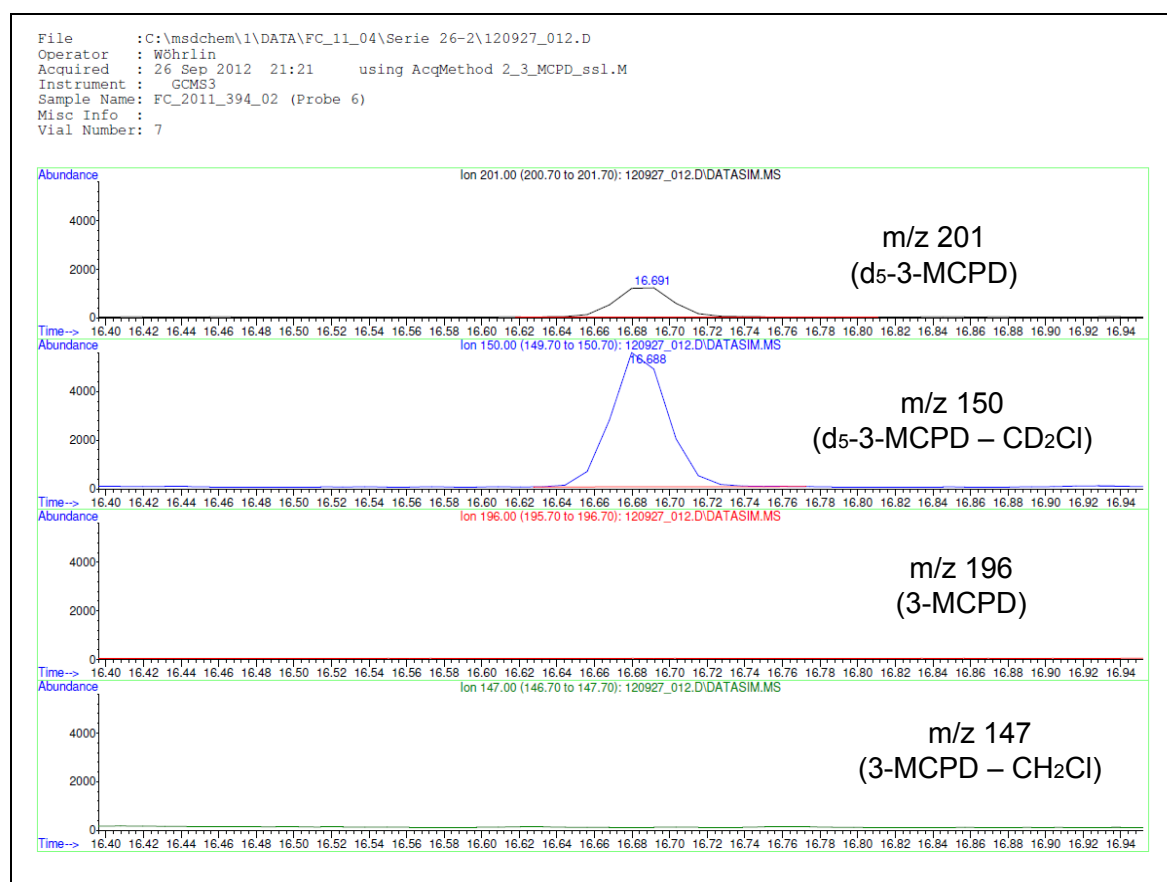


Abbildung 13 Chromatogramm der aufgenommenen Fragmentionen der Methode A einer Humanmilchprobe. Dotierung 0,3  $\mu\text{g}$  d<sub>5</sub>-3-MCPD (eingesetzt als 1,62  $\mu\text{g}$  d<sub>5</sub>-3-MCPD-Bispalmitat). 3-MCPD konnte in keiner Humanmilchprobe nachgewiesen werden.

Die untersuchten Humanmilchproben sind in Tabelle 17 im Anhang beschrieben. Dort sind neben den Geburtsdaten von Mutter und gestilltem Kind der Zeitpunkt der Milchnahme (Alter des Kindes) sowie der gravimetrisch ermittelte Fettgehalt der Probe angegeben.

Zur Freisetzung von 3-MCPD wendeten Zelinková *et al.* (2008) eine Säure-katalysierte Esterhydrolyse an. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit das nach Methode A extrahierte MilCHFett von neun Milchproben zusätzlich mit der Methode für Säuglingsmilchnahrung (Methode B) untersucht (Probennummern 1, 4a, 5b, 6a, 9, 10, 15, 18 und 24c). Auch mit dieser Methode lag kein Messwert über der Nachweisgrenze von 63 µg/kg für 3-MCPD bzw. 27 µg/kg für 2-MCPD.

Im Zusammenhang mit der Bereitstellung von Humanmilch wurden die Probandinnen gebeten, einen Fragebogen auszufüllen, um ihre Exposition gegenüber mit 3-MCPD-Estern belasteten Lebensmitteln in den letzten 10 Jahren einschätzen zu können.

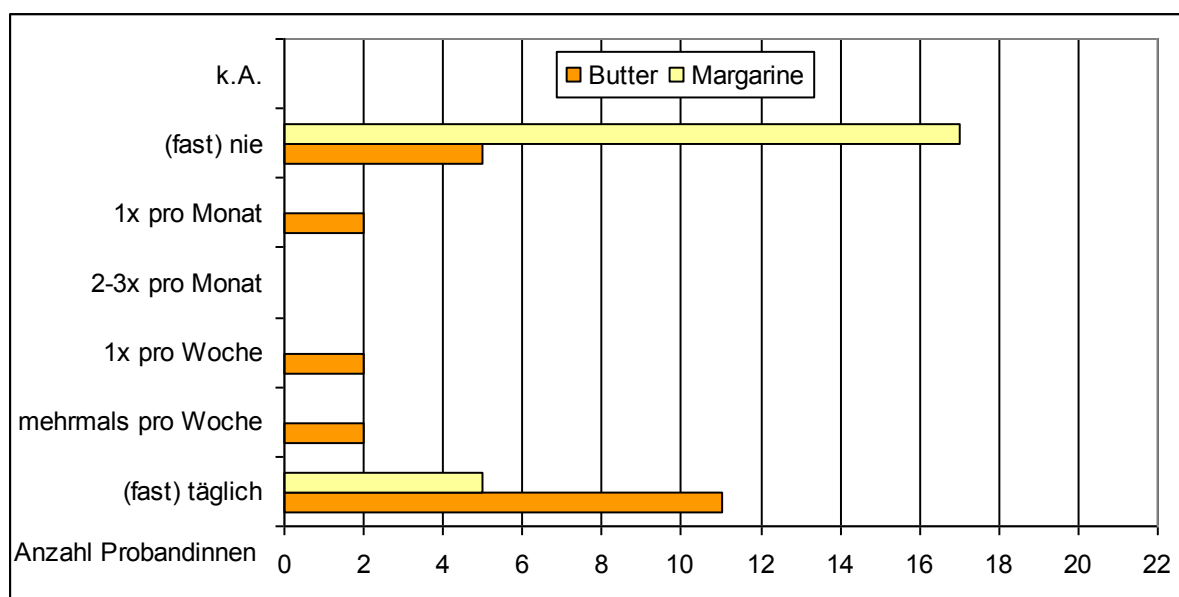


Abbildung 14 Häufigkeit des Verzehrs von Streichfetten

Insgesamt waren 20 der 22 Befragten Mischköstlerinnen, eine Frau ernährte sich vegetarisch. Eine weitere Frau gab an, sich im ersten Jahr des Erhebungszeitraumes vegetarisch und in den folgenden 9 Jahren mit üblicher Mischkost ernährt zu haben. Fünf Frauen aßen täglich Margarine (alle anderen gaben an, nie Margarine zu verzehren). Elf Frauen verzehrten hingegen täglich Butter (Abbildung 14). Fettthaltige Süßigkeiten wurden von 19 Frauen mindestens wöchentlich, von 9 Frauen sogar täglich verzehrt, süße Brotaufstriche aßen 11 Frauen mindestens wöchentlich. Frittierte Lebensmittel wie Pommes frites wurden hingegen von 16 Frauen seltener als einmal pro Woche verzehrt. Dasselbe gilt für fettgebackene Sü-

ßigkeiten wie Krapfen oder Doughnuts, die von 13 Frauen nie bzw. von 19 Frauen seltener als wöchentlich verzehrt wurden. Herzhafte Snacks wie Chips wurden von zwei Frauen 1x pro Woche, von 20 Frauen jedoch deutlich seltener verzehrt. Gebratene Lebensmittel (z.B. Bratkartoffeln, Kartoffelpuffern oder Fleisch) wurden hingegen von 15 Frauen mindestens wöchentlich verzehrt. Elf Frauen kochten fast täglich zuhause, 10 Frauen mehrmals pro Woche. Frittier- und Bratfette wurden von 6 Frauen mindestens einmal pro Woche verwendet. Der überwiegende Anteil der Probandinnen verwendet Raps-, Sonnenblumen- oder Olivenöl. Distel-, Traubenkern- und Walnussöl wurden hingegen fast nie verwendet. Die grafische Auswertung des Fragebogens ist im Anhang zu finden (6.3). Die Ergebnisse des Fragebogens zeigen, dass Lebensmittel wie Margarine, Olivenöl oder fetthaltige Süßigkeiten, in denen gebundenes 3-MCPD, 2-MCPD und Glycidol nachgewiesen wurden, von den Frauen in den vergangenen 10 Jahren teilweise sogar täglich verzehrt wurden. Eine mangelnde Exposition der Mütter gegenüber belasteten Lebensmitteln ist somit keine Erklärung dafür, dass in den Milchproben kein gebundenes MCPD nachgewiesen werden konnte.

#### **4.4 Untersuchungsergebnisse der Ziegenmilchproben**

Insgesamt wurden 14 Ziegenmilchproben von 7 Ziegen mit der für flüssige Milch entwickelten Methode (Methode A) untersucht. In Tabelle 18 (Anhang 6.5) sind neben den Geburtsdaten der Ziegen der Zeitpunkt der Milchabgabe in Tagen nach Geburt des Lammes angegeben sowie der gravimetrisch ermittelte Fettgehalt der Milchprobe. In keiner der untersuchten Proben konnte gebundenes 2-MCPD oder 3-MCPD nachgewiesen werden. Analog zur Untersuchung der Humanmilchproben wurden zwei Ziegenmilchproben (419b und 429b) mittels saurer Hydrolyse mit Methode B untersucht. Auch hier konnte weder 2-MCPD noch 3-MCPD im Milchfett nachgewiesen werden.

#### **4.5 Entwicklung einer Methode zur indirekten Bestimmung von gebundenem 3-MCPD, 2-MCPD und Glycidol in Säuglingsmilchnahrung**

Ende des Jahres 2012 wurde von Ermacora und Hrnčirik (2012) eine Methode zur simultanen Bestimmung von gebundenem 3-MCPD, 2-MCPD und Glycidol publiziert. In einem ersten Schritt werden zunächst die intakten GE in eine stabilere Verbindung umgewandelt, bevor die eigentliche Esterhydrolyse stattfindet. Die Methode wurde bislang nur für Speisefette und -öle, nicht aber auf fetthaltige Lebensmittel angewandt.

### 4.5.1 Untersuchungen zur Esterhydrolyse

Die säurekatalysierte Esterhydrolyse nimmt mit 16 Stunden viel Zeit in Anspruch, zudem ist die alkalisch katalysierte Esterhydrolyse in vielen Laboren bereits etabliert. Deshalb wurde in einem ersten Schritt getestet, ob die vom BfR entwickelte Methode (Wöhrlin *et al.*, 2011) für die alkalische Esterhydrolyse um die von Ermacora und Hrncirik (2012) entwickelte Methode der Umwandlung der intakten GE in 3-MBPD-Monoester erweitert werden kann. Hierfür wurden ein natürlich belastetes Hartfett sowie eine dotierte Blankprobe (unraffiniertes Leinöl, Dotierung 1 mg/kg gebundenes 2- und 3-MCPD bzw. 2,2 mg/kg gebundenes Glycidol) jeweils 2 Mal mittels saurer bzw. alkalischer Hydrolyse aufgearbeitet. Die alkalische Hydrolyse erfolgte nach BfR-Methode 9 (Abschnitt 3.1.1), die saure Hydrolyse nach der von Ermacora und Hrncirik (2012). Die Umwandlung der GE erfolgte bei beiden Proben nach der Methode von Ermacora und Hrncirik. Tabelle 10 zeigt die Ergebnisse. Beide Methoden liefern vergleichbare Ergebnisse. Jedoch ist auffällig, dass bei allen drei Analyten Gehalte, die mit der modifizierten BfR-Methode 9 ermittelt wurden, tendenziell höher lagen als die, die unter Verwendung der Säure-katalysierten Esterhydrolyse ermittelt wurden (Ausnahme Spike Leinöl für Glycidol).

Tabelle 10 Vergleich der Analysenergebnisse nach saurer bzw. alkalisch katalysierter Esterhydrolyse.

	gebundenes 3-MCPD saure Hydrolyse (mg/kg)	gebundenes 3-MCPD alkalische Hydrolyse (mg/kg)	gebundenes 2-MCPD saure Hydrolyse (mg/kg)	gebundenes 2-MCPD alkalische Hydrolyse (mg/kg)	gebundenes Glycidol saure Hydrolyse (mg/kg)	gebundenes Glycidol alkalische Hydrolyse (mg/kg)
<b>Kalibriergerade</b>						
Korrelationskoeffizient	0,9994	0,9993	0,9997	0,9985	0,9987	0,9947
Steigung	3,6767	3,027	3,0289	2,8221	1,3378	1,3555
<b>Proben</b>						
Spike Leinöl I	0,969	1,034	0,990	1,121	2,219	2,102
Spike Leinöl II	0,994	1,082	1,009	1,013	2,194	2,140
Hartfett I	2,747	3,086	1,395	1,606	2,159	2,348
Hartfett II	2,605	2,817	1,321	1,479	2,094	2,235

In einem weiteren Versuch wurde getestet, ob der Schritt der GE-Umwandlung die Quantifizierung der anderen Analyten beeinflusst. Hierfür wurde unbelastetes Blank-Öl einzeln mit gebundenem 3-MCPD, 2-MCPD und Glycidol sowie den jeweils zugehörigen deuterierten internen Standards dotiert (jeweils 3 Proben, 2 Konzentrationsstufen, insgesamt 72 Proben). Die Spikeproben wurden in vier Gruppen eingeteilt. Bei Proben der Gruppe 1 und 2 wurde eine alkalisch katalysierte Esterhydrolyse durchgeführt, bei Proben der Gruppe 3 und 4 eine



Säure katalysierte Esterhydrolyse. Proben der Gruppen 1 und 3 wurden für die Transformation der GE mit NaBr-Schwefelsäure vorbehandelt, Proben der Gruppen 2 und 4 wurden nicht vorbehandelt. Alle vier Gruppen wurden hinsichtlich ihres Gehaltes an gebundenem 3-MCPD, 2-MCPD und Glycidol untersucht.

Die Beurteilung der Ergebnisse erfolgte nur qualitativ, da nicht zu jeder Probe jeder interne Standard zugegeben wurde, da die deuterierten Verbindungen in der Regel minimale Anteile des unmarkierten Standards enthalten. Eine externe Kalibrierung ist aufgrund der großen Unterschiede in der Signalintensität zwischen Kalibriergerade und Proben nicht möglich.

In jeder Probe der Gruppe 1, auch in den Proben, zu denen nur gebundenes 2-MCPD bzw. gebundenes 3-MCPD zugegeben wurde, waren 3-MBPD als auch 3-MBPD- $d_5$  nachweisbar. Beurteilt anhand der Flächen des Quantifizierungsions  $m/z$  240 für 3-MBPD bzw.  $m/z$  245 für 3-MBPD- $d_5$  unterscheiden sich die Signalintensitäten dabei nicht deutlich von den Proben, zu denen tatsächlich gebundenes Glycidol dotiert wurde (Annahme gleiche Signalintensität von 3-MBPD und 3-MBPD- $d_5$ ).

In allen vorbehandelten Proben, bei denen die Esterhydrolyse alkalisch katalysiert durchgeführt wurde, ist als Reaktionsprodukt 2-MBPD bzw. 2-MBPD- $d_5$  nachweisbar. Dabei gibt es keinen Unterschied zwischen den Proben, zu denen gebundenes 2-MCPD bzw. 3-MCPD dotiert wurde, und denen, zu denen Glycidol zudotiert wurde (beurteilt an der Signalintensität  $m/z$  240 bzw  $m/z$  245).

Unabhängig von den Beobachtungen zur Entstehung von 2- bzw. 3-MBPD ist in den Proben der Gruppe 1 und 2 auch ein geringer Anteil (<1% der Signalfäche) an 2-MCPD nachweisbar, zu denen nur gebundenes 3-MCPD dotiert wurde, sowie ein geringer Anteil 3-MCPD in den Proben, zu denen nur gebundenes 2-MCPD dotiert wurde, nachweisbar. Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass bei der alkalisch katalysierten Esterhydrolyse möglicherweise reaktive Zwischenprodukte entstehen, aus denen 2-MCPD bzw. 3-MCPD gebildet wird, obwohl diese in der ursprünglichen Proben nicht enthalten waren. Da jedoch die Wiederfindung der dotierten Proben der Gruppen 1 und 2 für 2-MCPD bzw. für 3-MCPD 100 bzw. 110 % betrug, liegt es nahe, dass sich der jeweilige interne Standard in ähnlichem Ausmaß umwandelt. Diese Umwandlung hat deshalb keinen Einfluss auf die Quantifizierung der ermittelten Gehalte.

Bei den Proben der Gruppe 3 und 4 wurden keine Umwandlungsprodukte festgestellt, es ist jeweils nur der Analyt identifizierbar, der auch tatsächlich dotiert wurde. Die Wiederfindung liegt für alle drei Analyten zwischen 94 und 107 %.

Das Signalverhältnis 3-MBPD/2-MBPD der Proben, zu denen Glycidol dotiert wurde (m/z 240), beträgt bei der Säure-katalysierten Esterhydrolyse etwa 19-20, bei der alkalisch katalysierten Esterhydrolyse lediglich 2 bis maximal 6 bei Proben und Kalibrierstandards.

Somit wurde gezeigt, dass der Schritt der GE-Umwandlung die Quantifizierung der anderen Analyten bei der alkalisch katalysierten Esterhydrolyse beeinflusst. Aufgrund der Instabilität der Analyten während der alkalischen Esterhydrolyse und des ungünstigen Verhältnisses von 3-MBPD/2-MBPD wurde davon abgesehen, die BfR-Methode 9 um die Bestimmung von GE zu erweitern. Für die Analytik der Säuglingsmilchnahrungsproben wurde deshalb die Esterhydrolyse Säure-katalysiert durchgeführt.

#### 4.5.2 Entwicklung einer Methode zur Extraktion von Fett aus Säuglingsmilchnahrung

Die Extraktion des Milchfetts aus Säuglingsmilchpulver wurde mittels beschleunigter Lösungsmittlextraktion (ASE) getestet. Im Berliner Handel wurden hierfür 12 Säuglingsanfangs- und Folgenahrungen von unterschiedlichen Herstellern bezogen und die Fettextraktion zunächst nach einer für fetthaltige Lebensmittel optimierten Methode durchgeführt (BfR-Methode 22, Fry *et al.* 2013). Dabei wurden 2,5 g Milchpulver mit einem Lösungsmittelgemisch aus Petrolether/Isohexan/Aceton (2/2/1, v/v/v) in zwei Extraktionszyklen bei einer Temperatur von 125 °C extrahiert. Nur bei vier der zwölf Proben lag der Fettgehalt über 20 %, bei sechs Proben lag der Fettgehalt sogar unter 5 %. Daraufhin wurden verschiedene Zusammensetzungen der Lösungsmittel Petrolether, Isohexan und Aceton, verschiedene Probeneinwaagen und die Zugabe von Wasser in die Extraktionszelle bei unterschiedlichen Extraktionstemperaturen (80-125°C) getestet. Ein Probeneinsatz von 2 g Milchpulver, vermisch mit 4,7 g Dispersionsmittel und 0,8 ml Wasser erwies sich schließlich als günstig. Drei Extraktionszyklen mit Isohexan und Aceton (8/2 v/v) bei einer Extraktionstemperatur von 100°C, ergaben bei allen Proben Fettgehalte von über 20 %.

#### 4.5.3 Einfluss der Fettextraktion auf das Analysenergebnis

Um den Einfluss der Fettextraktion auf das Analysenergebnis zu testen, wurden vier Proben vor bzw. nach der Extraktion dotiert sowie vier Proben ohne Dotierung analysiert. Es wurden jeweils 2 g Milchpulver mit 1,68 µg gebundenem MCPD und 2,52 µg gebundenem Glycidol vor der ASE dotiert bzw. 100 mg des extrahierten Fetts mit 0,30 µg gebundenem MCPD und 0,45 µg gebundenem Glycidol dotiert und die Wiederfindungsraten berechnet. Tabelle 11

zeigt die Mittelwerte der gemessenen Konzentrationen aus der jeweiligen Vierfachbestimmung an sowie die daraus bestimmten Wiederfindungsraten.

Beim Vergleich der Mittelwerte der Gehalte an gebundenem 3-MCPD, 2-MCPD und Glycidol ergab die Varianzanalyse, dass sich die Werte vor und nach der Extraktion nicht signifikant unterscheiden; der Einfluss der Extraktion mit ASE auf das Analyseergebnis ist damit unwahrscheinlich. In Tabelle 11 sind die berechneten Prüfgrößen für jeden Analyten angegeben.

Tabelle 11 Wiederfindungsraten bei Dotierung von Säuglingsanfangsnahrung vor und nach der ASE, ausgedrückt als freies 2- und 3-MCPD bzw. Glycidol in mg/kg Fett sowie Ergebnisse der einfaktoriellen Varianzanalyse

		2-MCPD	3-MCPD	Glycidol
<b>ohne Dotierung (n=4)</b>	<b>Mittelwert (mg/kg)</b>	<b>0,17</b>	<b>0,43</b>	<b>0,23</b>
Dotierung vor der Extraktion (n=4)	Mittelwert (mg/kg) $\pm$ SD	2,88 $\pm$ 0,08	3,15 $\pm$ 0,03	4,37 $\pm$ 0,14
	Dotierung (mg/kg)	3,00	3,00	4,50
	<b>Wiederfindung %</b>	<b>91%</b>	<b>92%</b>	<b>92%</b>
Dotierung nach der Extraktion (n=4)	Mittelwert (mg/kg) $\pm$ SD	2,73 $\pm$ 0,42	3,35 $\pm$ 0,33	4,33 $\pm$ 0,66
	Dotierung (mg/kg) <sup>1</sup>	3,04	3,04	4,56
	<b>Wiederfindung %</b>	<b>90%</b>	<b>110%</b>	<b>95%</b>
<b>Prüfgröße F</b> (Kritischer F-Wert: 5,99)		<b>0,49</b>	<b>1,48</b>	<b>0,02</b>

#### 4.5.4 Untersuchungen zur geeigneten Kalibrierung

Anforderungen an eine geeignete Kalibrierung sind in Abschnitt 4.2.3 formuliert. Um eine geeignete Blankmatrix für die Untersuchung von Säuglingsmilchnahrung zu identifizieren, wurde das Fett von 12 verschiedenen Säuglingsmilchnahrungen sowie von Kaffeeweißer und einem Milchaustauscher für Kälber extrahiert und analysiert. Der untersuchte Kaffeeweißer enthielt nur geringfügig niedrigere Gehalte an gebundenem 2-MCPD, 3-MCPD und Glycidol (0,13, 0,20 und 0,31 mg/kg) als die bis dahin untersuchten Säuglingsmilchnahrungen. Ein untersuchter Milchaustauscher für Kälber ergab einen Gehalt an gebundenem Glycidol, 3-MCPD und 2-MCPD von 1,81 mg/kg Fett, 0,80 mg/kg und 2,96 mg/kg. Für die Anwendung der Methode für Säuglingsmilch wurde für gebundenes 3-MCPD, 2-MCPD und Glycidol jeweils eine Matrixkalibrierung durch Dotierung von Blanköl (unraffiniertes Leinöl) hergestellt und Steigung und Bestimmtheitsmaß der Kalibriergeraden mit den Ergebnissen einer Standardkalibrierung verglichen. Beide Geraden verliefen nahezu parallel, die Steigung

<sup>1</sup> Mittelwert Dotierung berechnet auf Probeneinwaage und Fettrückwaage

der Standardkalibrierung für Glycidol, eingesetzt als Glycdiyl-Oleat, war 2 % größer und damit steiler als die der Matrixkalibrierung. Dies lag in der üblichen Variationsbreite bei wiederholten Messungen. Die Steigungen der Standard- und Matrixkalibriergeraden von 2-MCPD und 3-MCPD unterschieden sich ebenfalls nur marginal. Das Bestimmtheitsmaß lag jeweils  $>0,99$ . Für die Analytik von Säuglingsmilchnahrung wurde deshalb eine Standardkalibrierung ohne Matrix durchgeführt.

Methode B, die für die Analyse der Säuglingsmilchnahrung verwendet wurde, entspricht damit der von Ermacora und Hrncirik (2012) entwickelten Methode. Sie wurde um die Fettextraktion mittels ASE erweitert. Die Methodenparameter sind in Abschnitt 3.7 aufgeführt. Die Methode wurde für die Matrix Säuglingsmilchnahrung validiert, die Validierungsergebnisse sind in Anhang 6.8.1 aufgeführt.

#### **4.6 Untersuchung zur Belastung von Säuglingsmilchnahrung**

In Abbildung 15 sind die 70 Einzelergebnisse für gebundenes Glycidol, 3-MCPD und 2-MCPD als Säulen, getrennt nach Handelsmarke bzw. Pre- und 1-Nahrung, dargestellt. Werte unterhalb der Nachweis- bzw. Bestimmungsgrenze wurden in den Darstellungen und in den nachfolgenden statistischen Rechnungen mit dem halben Wert der jeweiligen Grenzen berücksichtigt.

Der Mittelwert  $\pm$  SD lag für Glycidol bei  $0,356 \pm 0,262$  mg/kg Fett (Median 0,253 mg/kg Fett). Sechs Proben lagen unterhalb der Bestimmungsgrenze von 0,148 mg/kg, das Maximum lag bei 1,304 mg/kg Fett.

Der Mittelwert  $\pm$  SD lag für 2-MCPD bei  $0,185 \pm 0,088$  mg/kg Fett (Median 0,196 mg/kg Fett). Vierzehn Proben lagen unterhalb der Bestimmungsgrenze von 0,126 mg/kg Fett, das Maximum lag bei 0,582 mg/kg Fett.

Der Mittelwert  $\pm$  SD lag für 3-MCPD bei  $0,416 \pm 0,142$  mg/kg Fett (Median 0,413 mg/kg Fett). 3-MCPD war in allen untersuchten Säuglingsanfangsnahrungen quantitativ bestimmbar; der niedrigste Wert war 0,192 mg/kg Fett, der höchste betrug 1,220 mg/kg Fett.

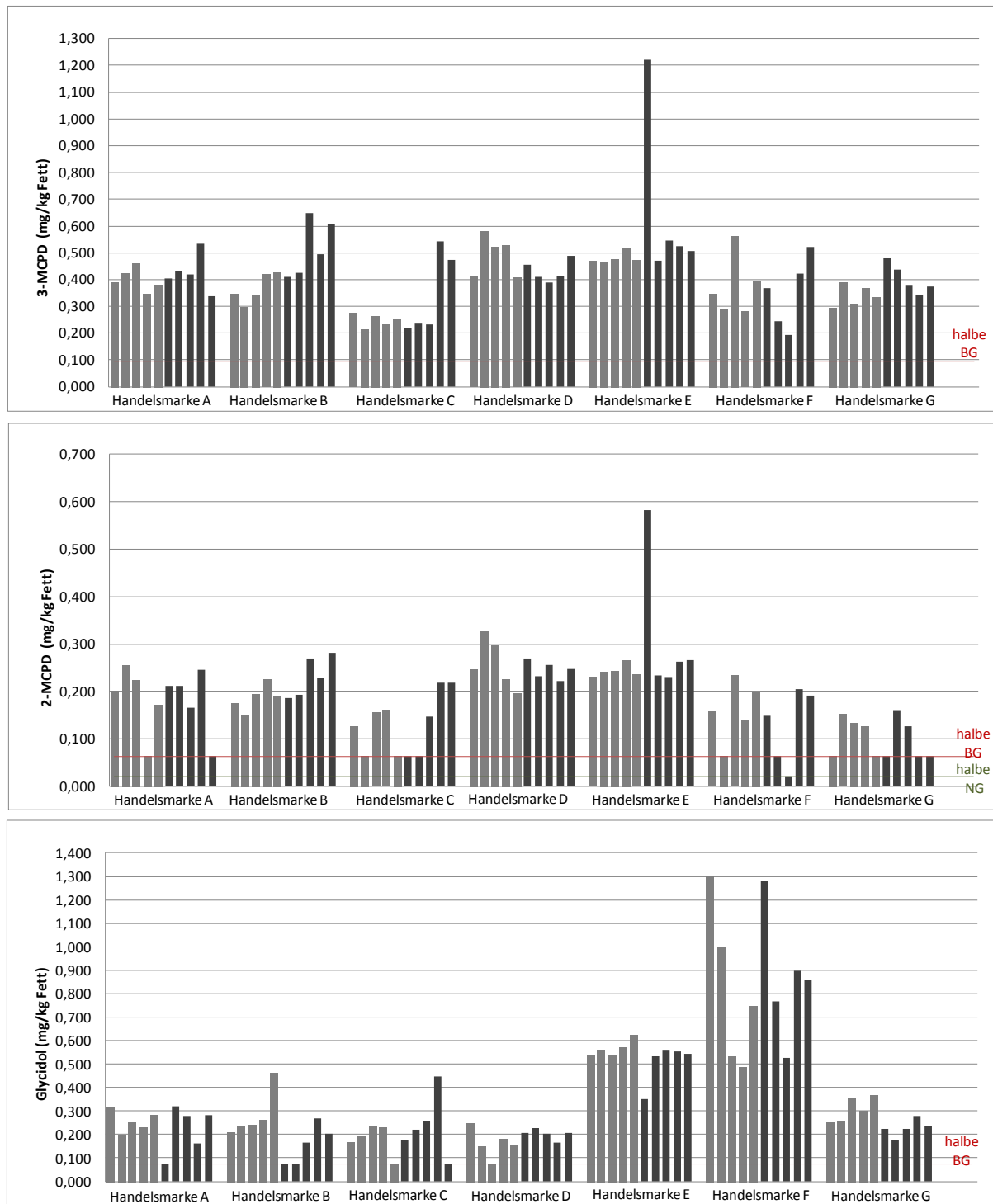


Abbildung 15a-c Gehalt an gebundenem 3-MCPD, 2-MCPD und Glycidol in 70 Proben von Säuglingsmilchnahrung, getrennt nach Handelsmarke (je Marke n=10). Hellgraue Säulen: Pre-Nahrung, dunkelgraue Säulen: 1-Nahrung. Werte <NG bzw. <BG sind mit der jeweiligen halben Grenze berücksichtigt.

#### 4.6.1 Vergleich Pre- und 1-Nahrung

In Tabelle 12 sind die Werte für die drei Analyten separat für Pre- und 1-Nahrung ausgewertet (jeweils n=35, alle Handelsmarken zusammengefasst). Die beobachteten Differenzen in der Verteilung sind nicht signifikant. Wie in Abbildung 15 zu erkennen ist, fallen bei Betrachtung der einzelnen Handelsmarken keine gravierenden Differenzen zwischen den Gehalten der 3 Analyten bei Pre- und 1-Nahrung auf. Eine statistische Prüfung für Pre- und 1-Nahrung für jede Handelsmarke erschien aufgrund der geringen Probenzahl von jeweils insgesamt 10 nicht sinnvoll.

Tabelle 12 Vergleich von Mittelwert  $\pm$  SD und Medianwert für Glycidol, 2-MCPD und 3-MCPD in Pre- und 1-Nahrung.

		Anzahl Proben	Mittelwert $\pm$ SD (mg/kg Fett)	Median (mg/kg Fett)
<b>Glycidol</b>	Pre-Nahrung	35	0,366 $\pm$ 0,258	0,254
	1-Nahrung	35	0,346 $\pm$ 0,269	0,238
<b>3-MCPD</b>	Pre-Nahrung	35	0,386 $\pm$ 0,096	0,388
	1-Nahrung	35	0,446 $\pm$ 0,172	0,426
<b>2-MCPD</b>	Pre-Nahrung	35	0,179 $\pm$ 0,071	0,191
	1-Nahrung	35	0,191 $\pm$ 0,103	0,211

#### 4.6.2 Vergleich der Handelsmarken

In Tabelle 13 sind die Mittelwerte  $\pm$  SD der drei Analyten für die sieben untersuchten Handelsmarken dargestellt.

Tabelle 13 Mittelwert  $\pm$  SD, getrennt nach Handelsmarken (Pre- und 1-Nahrung zusammen, jeweils n=10)

Handelsmarke	Glycidol (mg/kg Fett)	3-MCPD (mg/kg Fett)	2-MCPD (mg/kg Fett)
A	0,239 $\pm$ 0,077	0,413 $\pm$ 0,057	0,181 $\pm$ 0,068
B	0,220 $\pm$ 0,111	0,442 $\pm$ 0,112	0,210 $\pm$ 0,042
C	0,208 $\pm$ 0,105	0,294 $\pm$ 0,116	0,128 $\pm$ 0,063
D	0,182 $\pm$ 0,049	0,461 $\pm$ 0,066	0,252 $\pm$ 0,038
E	0,538 $\pm$ 0,071	0,567 $\pm$ 0,231	0,280 $\pm$ 0,107
F	0,840 $\pm$ 0,292	0,362 $\pm$ 0,118	0,142 $\pm$ 0,071
G	0,249 $\pm$ 0,086	0,361 $\pm$ 0,077	0,097 $\pm$ 0,048

Wie schon in Abbildung 15 erkennbar, fallen bei gebundenem Glycidol die Handelsmarken E und F durch vergleichsweise hohe Gehalte auf. Bei den 20 Proben dieser beiden Marken lag nur ein Wert unter 0,4 mg/kg Fett, während bei den 50 Proben der anderen Marken nur zwei

Proben oberhalb dieses Wertes lagen. Die Mittelwerte von 0,538 und 0,840 mg/kg Fett bei den Handelsmarken E bzw. F lagen deutlich über den Mittelwerten der anderen Handelsmarken, deren höchster Mittelwert 0,249 mg/kg Fett betrug. Die genannten 20 Proben der Handelsmarken E und F unterschieden sich damit in der Verteilung der Werte deutlich von den 50 Proben der anderen Handelsmarken. Vergleichbare Unterschiede gab es bei den Werten für 3-MCPD und 2-MCPD nicht. Bei 3-MCPD war zwar der Mittelwert für die Handelsmarke E ebenfalls am höchsten, dies war jedoch durch einen besonders hohen Wert von 1,220 mg/kg Fett in einer einzelnen Probe bedingt; dieser Wert lag deutlich über dem zweithöchsten Wert von 0,647 mg/kg Fett (Handelsmarke B, siehe Abbildung 15).

Mittels einfaktorieller Varianzanalyse wurde für jeden Analyten überprüft, ob sich die Mittelwerte der einzelnen Handelsmarken (Pre- und 1-Nahrung zusammengefasst) unterscheiden oder ob die Unterschiede zufallsbedingt sind. Der kritische F-Wert für den Vergleich von jeweils 10 Stichproben aus 7 Gruppen bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % beträgt 2,246. Für 2-MCPD beträgt die errechnete Prüfgröße F 10,15, für 3-MCPD 5,09 und für Glycidol 33,45. Die Unterschiede zwischen den Gruppen sind damit nicht zufallsbedingt; die Varianzanalyse ergibt, dass sich die Mittelwerte der einzelnen Handelsmarken für jeden Analyten unterscheiden.

#### 4.6.3 Korrelation der Analyten

Es wurde geprüft, ob ein Zusammenhang zwischen den Gehalten der einzelnen Analyten besteht. Abbildung 16 zeigt die Streudiagramme zwischen jeweils zwei Analyten. Zwischen Glycidol und 2-MCPD und Glycidol und 3-MCPD bestand keine Korrelation, während zwischen 2-MCPD und 3-MCPD eine hochsignifikante Korrelation bestand ( $p < 0,001$ ). Der Korrelationskoeffizient nach Pearson beträgt 0,855, der Korrelationskoeffizient nach Spearman beträgt 0,817.

#### 4.6.4 Vergleich der Fettgehalte

Die ermittelten Fettgehalte in den Säuglingsmilchproben lagen i.d.R. im Bereich des auf der Packung deklarierten Fettgehaltes. Abweichungen gab es bei den fünf Proben der 1-Nahrung C, hier wurde ein durchschnittlicher Fettgehalt von 20,4 ( $\pm 1,06$ ) % statt dem auf der Packung angegebene Wert von 26,0 % ermittelt. Etwas niedriger als angegeben lag der Fettgehalt ebenfalls bei allen Produkten der Handelsmarke D (Pre-Nahrung 19,9 ( $\pm 2,57$ ) % statt 25,0 %; 1-Nahrung 19,7 ( $\pm 1,62$ ) % statt 25,0 %), sowie mit 21,7 ( $\pm 2,63$ ) % statt 27,0 % bei vier der fünf 1-Nahrungen der Drogeriemarkteigenmarke E. In einer Charge wurden hier 27 % Fett ermittelt.

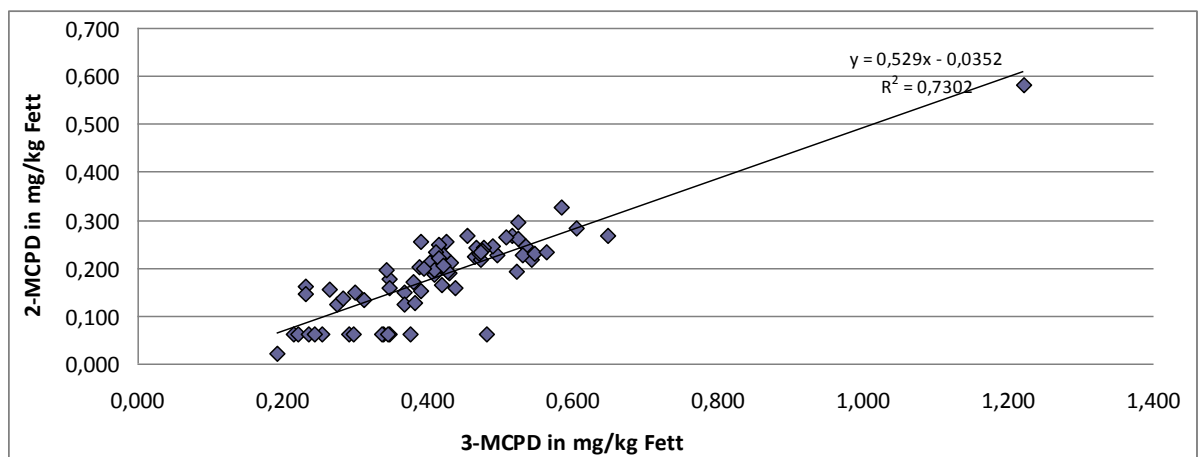
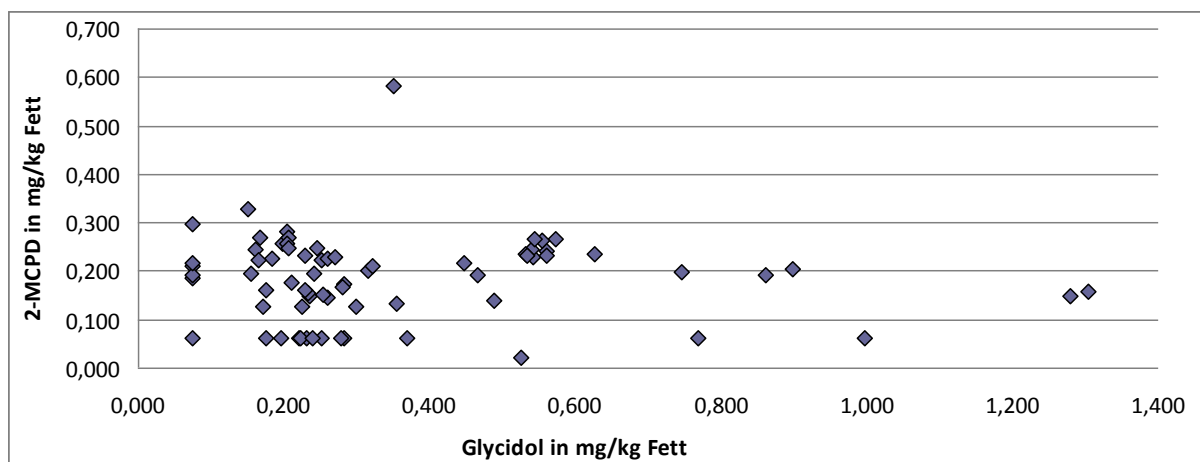
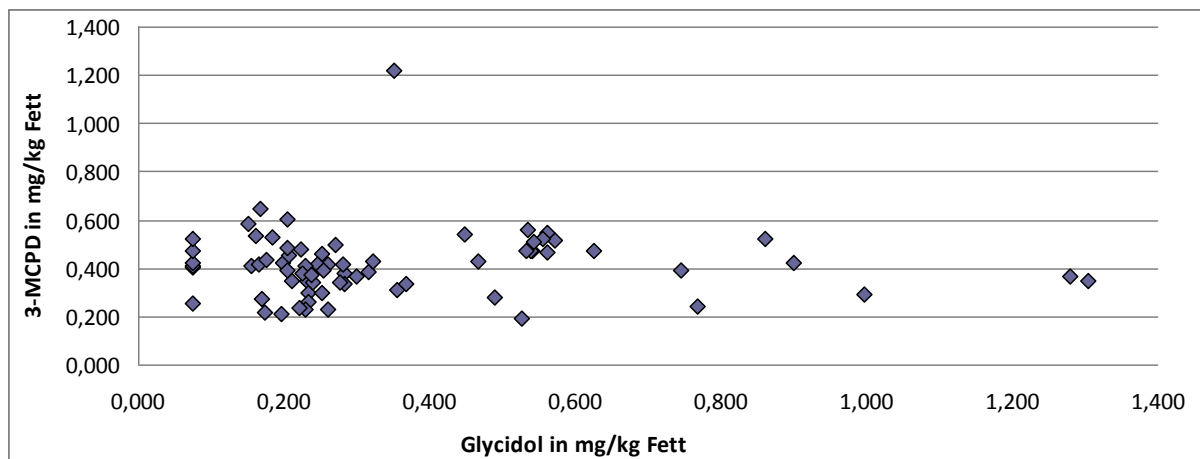


Abbildung 16a-c Streudiagramme der Gehalte an gebundenem 3-MCPD, 2-MCPD und Glycidol in 70 Säuglingsmilchnahrungen. Zwischen 2-MCPD und 3-MCPD besteht eine hochsignifikante Korrelation ( $p < 0,001$ )



## 4.7 Vergleich der direkten und indirekten Bestimmungs- methode

Einige Proben der untersuchten Säuglingsmilchnahrungen wurden zusätzlich mit der LC-APCI-MS-Methode (Methode C) analysiert, um zu identifizieren, mit welchen Fettsäuren das Glycidol in den Proben verestert ist. Zudem sollten die Ergebnisse der indirekten Bestimmung der Methode B abgesichert werden. Insgesamt wurden 18 Proben ausgewählt: 11 Proben der vergleichsweise hoch belasteten Proben der Handelsmarken E und F sowie 7 niedrig belastete Proben der Handelsmarke C.

Aus den Ergebnissen der Einzelbestimmungen der sieben untersuchten GE wurden die Glycidol-Äquivalente berechnet (vgl. Abschnitt 3.8). In Tabelle 14 sind die mit direkter und indirekter Methode ermittelten Ergebnisse zusammengestellt. Der nach der direkten GE-Bestimmung berechnete Glycidol-Gehalt ist dabei immer niedriger als der Gehalt an gebundenem Glycidol, der mit Methode B nach Esterhydrolyse bestimmt wurde.

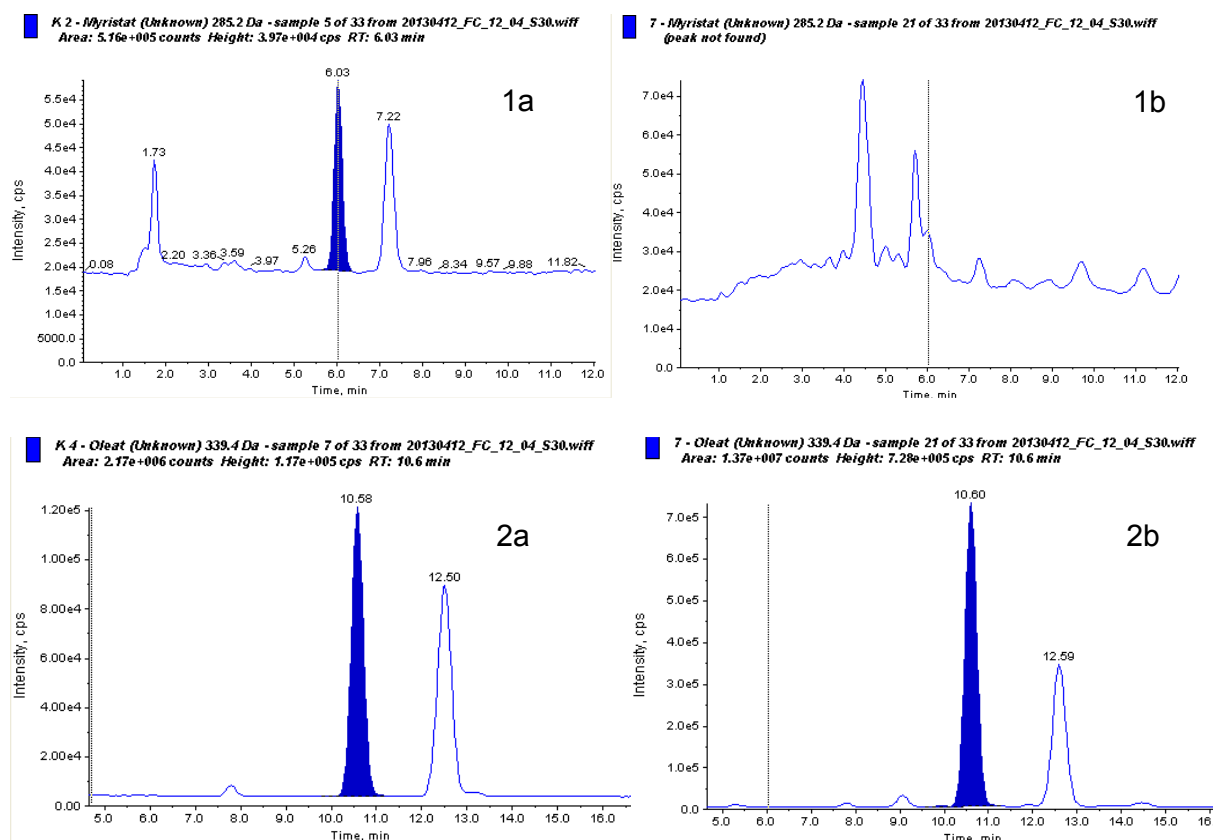


Abbildung 17 Vergleich der Chromatogramme von Standardlösung und Probe (Säuglingsmilchnahrung, Probe 1-Nahrung F1). Glycidyl-Myristat ( $m/z$  285,2; RT 6,07 min) Standard-Lösung (1 ng/ml) (**1a**) und in Matrix (**1b**). Glycidyl-Oleat ( $m/z$  339,4; RT 10,6 min) Standard-Lösung (5 ng/ml) (**2a**) und in Matrix (**2b**). Die Konzentration an Glycidyl-Oleat in der Probe beträgt 30,79 ng/ml (2,79 mg/kg Öl). Die Ursache für das Signal bei RT 12,5 min sind die in Abschnitt 4.1.2 besprochenen Verunreinigungen.

Bei der direkten Analyse der Säuglingsanfangsnahrung war die Auswertung der Chromatogramme, trotz Probenaufreinigung mit zweifacher SPE, durch coeluierende Matrixbestandteile teilweise erheblich erschwert (vgl. Abbildung 17).

Dadurch konnten die Gehalte einiger GE nicht eindeutig bestimmt werden. Insbesondere das Analytsignal von Glycidol-Myristat war durch die zeitgleiche Elution von Matrixbestandteilen beeinträchtigt und konnte nicht integriert werden (Abbildung 17-1b). Glycidyl-Linoleat (0,05 bis 0,99 mg/kg Fett) und Glycidyl-Oleat (0,06 bis 2,79 mg/kg, Abbildung 17-2b) konnten in jeder Probe mittels LC-APCI-MS nachgewiesen werden. Glycidyl-Palmitat wurde mit Ausnahme von einer Probe ebenfalls in allen Proben nachgewiesen (< NG - 1,26 mg/kg Fett). Der Glycidyl-Stearat-Gehalt lag nur in zwei Proben oberhalb der Nachweisgrenze von 0,11 mg/kg Fett, jedoch unterhalb der Bestimmungsgrenze von 0,37 mg/kg Fett. Glycidyl-Linolenat war in 11 Proben nachweisbar (in allen Proben der 1-Nahrung F, jedoch in keiner der Proben 1-Nahrung C). Glycidyl-Laurat konnte nur in 3 Proben quantifiziert werden. Der Gehalt an Glycidyl-Myristat konnte nicht identifiziert werden, da im Bereich der Retentionszeit dieses Analyten die Massenspur durch Matrix stark beeinflusst war.

Im Rahmen der Teilnahme an einem Ringversuch wurde der Glycidol-Gehalt in sieben Speisefetten ebenfalls direkt und indirekt mit Methode C und B bestimmt. Tabelle 15 zeigt eine Übersicht über die Analysenergebnisse. Auch hier sind die berechneten Glycidol-Äquivalente aus der direkten Bestimmung immer niedriger als die Ergebnisse, die über die indirekte Methode bestimmt wurden (Ausnahme die sehr niedrig belastete Probe 3). Bei den meisten Proben Säuglingsmilchnahrung ist die Summe an gebundenem Glycidol wesentlich höher als die Gehalte die aus der direkten Bestimmung errechnet wurden.

In Abbildung 18 und Abbildung 19 sind die Ergebnisse der Analysen für Säuglingsmilch bzw. Speiseöle, die mit der direkten Methode erzielt wurden, gegen die Analysenergebnisse aufgetragen, die mit der indirekten Methode bestimmt wurden.

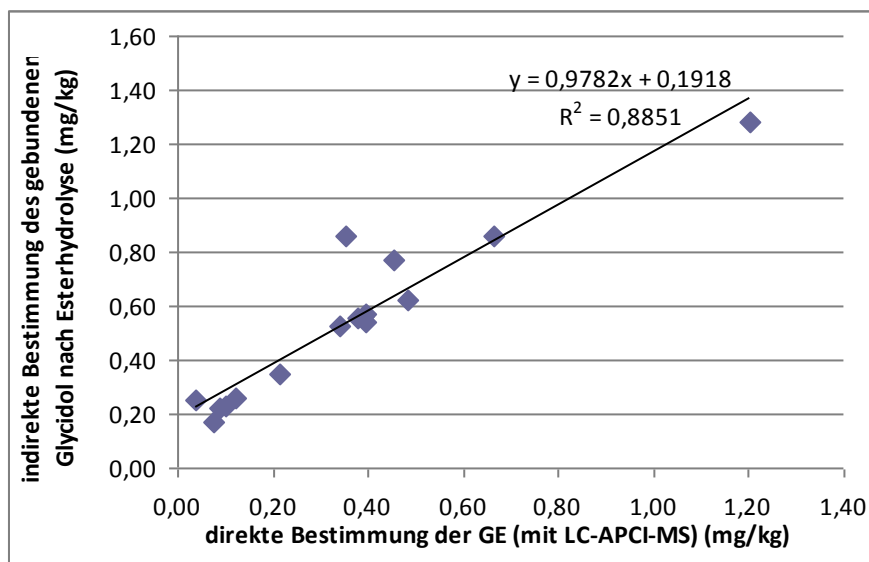


Abbildung 18 Vergleich der direkten und indirekten Bestimmung bei der Analyse von 18 Proben von Säuglingsmilchnahrung.

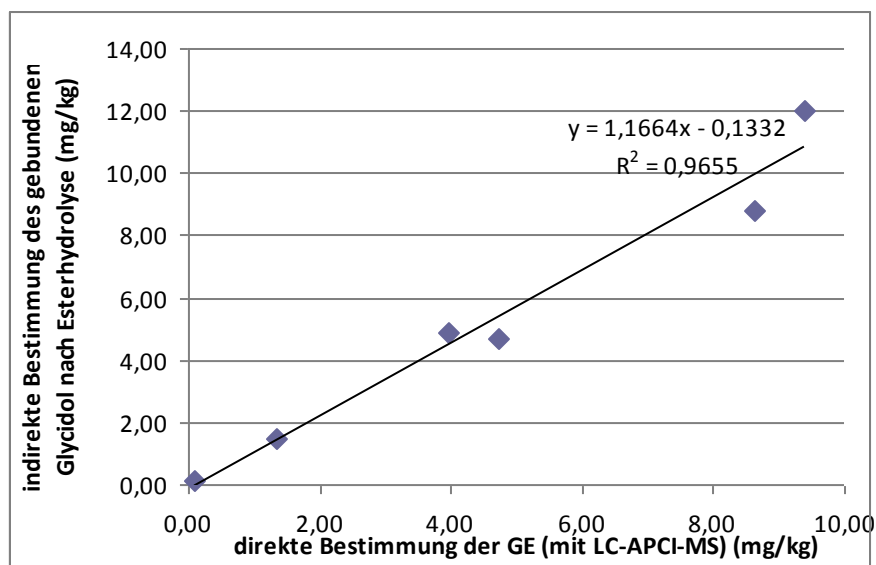


Abbildung 19 Vergleich der direkten und indirekten Bestimmung bei der Analyse von 7 Speisefetten und -ölen (Ringversuchsproben).

Die Ergebnisse zweier Säuglingsmilchnahrungen und einer Speiseölprobe, bei denen die Werte unterhalb der BG der indirekten Methode lagen, wurden nicht berücksichtigt.

Tabelle 14 Direkte Bestimmung von Glycidylfettsäureestern in Säuglingsmilchnahrung. Vergleich der indirekten Bestimmung mit der Summe der Glycidol-Äquivalente (fett gedruckt) aus der direkten Bestimmung

Probe Säuglings- milch-nahrung	Glycidyl- Linoleat (mg/kg)	Glycidyl- Oleat (mg/kg)	Glycidyl- Stearat (mg/kg)	Glycidyl- Palmitat (mg/kg)	Glycidyl- Linolenat (mg/kg)	Glycidyl- Laurat (mg/kg)	Glycidyl- Myristat <sup>a</sup> (mg/kg)	Summe Glycidol <sup>b</sup> (mg/kg) direkte Bestimmung Methode C	Glycidol (mg/kg) indirekt bestimmt mit Metho- de B	<i>Anteil Glycidol- Äquivalent direkte Messung an Ergebnis der indirekten Mes- sung</i>
1-Nahrung E_1	0,18	0,46	<NG	0,31	<NG	<NG	-	<b>0,21</b>	<b>0,35</b>	61%
1-Nahrung E_3	0,32	0,92	<NG	0,42	0,08	<NG	-	<b>0,39</b>	<b>0,56</b>	69%
1-Nahrung E_4	0,30	0,91	<NG	0,41	0,08	<NG	-	<b>0,38</b>	<b>0,55</b>	69%
1-Nahrung E_5	0,32	0,93	<NG	0,43	0,08	<NG	-	<b>0,39</b>	<b>0,54</b>	73%
PRE-Nahrung E_4	0,32	0,95	<NG	0,43	0,08	<NG	-	<b>0,40</b>	<b>0,57</b>	69%
PRE-Nahrung E_5	0,41	1,17	<NG	0,48	0,10	<NG	-	<b>0,48</b>	<b>0,63</b>	77%
PRE-Nahrung C_3	0,13	0,20	<NG	0,06	0,05	<NG	-	<b>0,10</b>	<b>0,23</b>	42%
PRE-Nahrung C_5	0,10	0,20	<NG	0,12	<NG	<NG	-	<b>0,09</b>	<b>&lt;BG</b>	
1-Nahrung C_1	0,06	0,19	<NG	0,08	<NG	<NG	-	<b>0,07</b>	<b>0,17</b>	42%
1-Nahrung C_2	0,07	0,24	<NG	0,08	<NG	<NG	-	<b>0,09</b>	<b>0,22</b>	39%
1-Nahrung C_3	0,08	0,26	<NG	0,11	<NG	0,08	-	<b>0,12</b>	<b>0,26</b>	48%
1-Nahrung C_4	0,05	0,06	<NG	0,05	<NG	<NG	-	<b>0,04</b>	<b>0,25</b>	14%
1-Nahrung C_5	0,05	0,15	<NG	<NG	<NG	<NG	-	<b>0,04</b>	<b>&lt;BG</b>	
1-Nahrung F_1	0,99	2,79	<BG	1,26	0,16	<NG	-	<b>1,20</b>	<b>1,28</b>	94%
1-Nahrung F_2	0,39	1,08	<NG	0,47	0,10	<NG	-	<b>0,46</b>	<b>0,77</b>	59%
1-Nahrung F_3	0,29	0,75	<NG	0,36	0,05	0,06	-	<b>0,34</b>	<b>0,53</b>	65%
1-Nahrung F_4	0,53	1,48	<BG	0,66	0,12	<NG	-	<b>0,66</b>	<b>0,86</b>	77%
1-Nahrung F_5	0,22	0,84	<NG	0,39	0,06	0,05	-	<b>0,35</b>	<b>0,86</b>	41%

a Glycidyl-Myristat konnte in Säuglingsmilchnahrung aufgrund chromatografischer Schwierigkeiten nicht quantifiziert werden

b Summe der GE berechnet als Glycidol-Äquivalent (Berechnung siehe Abschnitt 3.8)

Tabelle 15 Direkte Bestimmung von Glycidylfettsäureestern in Speisefetten und -ölen (Ringversuchsproben). Vergleich der indirekten Bestimmung mit der Summe der Glycidol-Äquivalente (fett gedruckt) aus der direkten Bestimmung

Speisefett- bzw. Ölprobe	Glycidyl-Linoleat (mg/kg)	Glycidyl-Oleat (mg/kg)	Glycidyl-Stearat (mg/kg)	Glycidyl-Palmitat (mg/kg)	Glycidyl-Linolenat (mg/kg)	Glycidyl-Laurat (mg/kg)	Glycidyl-Myristat (mg/kg)	Summe Glycidol <sup>a</sup> (mg/kg) direkte Bestimmung Methode C	Glycidol (mg/kg) indirekt bestimmt mit Methode B (Ermacora)	Anteil Glycidol-Äquivalent direkte Messung an Ergebnis der indirekten Messung
Probe 1	4,72	4,87	4,54	4,03	5,21	5,52	7,01	<b>8,62</b>	<b>8,77</b>	98%
Probe 2	1,09	1,24	0,90	1,18	1,64	<NG	<NG	<b>1,35</b>	<b>1,45</b>	93%
Probe 3	0,10	0,29	<NG	<NG	0,07	<NG	<NG	<b>0,22</b>	<b>&lt;BG</b>	
Probe 4	3,81	3,99	2,91	4,26	6,04	<NG	<BG	<b>4,71</b>	<b>4,71</b>	100%
Probe 5	0,09	0,25	<NG	<NG	0,06	<NG	<NG	<b>0,09</b>	<b>0,15</b>	60%
Probe 6	5,59	20,76	2,09	12,82	0,27	<NG	0,21	<b>9,40</b>	<b>12,04</b>	78%
Probe 7	1,36	5,35	8,45	2,69	0,08	<NG	<NG	<b>3,96</b>	<b>4,90</b>	81%

a Summe der GE berechnet als Glycidol-Äquivalent (Berechnung siehe Abschnitt 3.8)

## 5 Diskussion

Wesentliches Ziel dieser Arbeit war es, die aktuelle Expositionssituation von Säuglingen gegenüber den vor wenigen Jahren entdeckten MCPD- und Glycidyl-Fettsäureestern zu beschreiben. Hierbei stand die Entwicklung geeigneter analytischer Methoden zur Messung der Verbindungen in Humanmilch und Säuglingsmilchnahrung im Vordergrund. Im Rahmen dieser Methodenentwicklung wurden zunächst verschiedene Aspekte der komplexen Analytik genauer untersucht und verglichen.

### 5.1 Voruntersuchungen: Methodenvergleich zur Bestimmung von Glycidylfettsäureestern

Für die Bestimmung von GE in Lebensmitteln können direkte und indirekte Methoden angewendet werden. Dabei hat sich keines der beiden Prinzipien bisher als besser geeignet herausgestellt, um die aktuelle Belastung von Lebensmitteln zu untersuchen. Im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit wurden verschiedene Aspekte beider Quantifizierungsverfahren untersucht. Neben der Spezifität werden aufgrund der mittlerweile zu erwartenden Reduzierungserfolge bei der Herstellung von Lebensmitteln hohe Anforderungen an die Empfindlichkeit der Methoden gestellt. Erste Versuche zur Untersuchung von Analysemethoden im Rahmen dieser Arbeit erfolgten mit Speiseölen.

#### 5.1.1 Indirekter Nachweis (TF)

Da das durch Esterhydrolyse freigesetzte Glycidol aufgrund des niedrigen Molekulargewichts und der hohen Reaktivität nicht derivatisiert und anschließend gemessen werden kann, muss es in ein stabileres Molekül wie 3-MCPD oder 3-MBPD umgewandelt werden. In verschiedenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass diese Transformation nicht stöchiometrisch erfolgt (ein Molekül Glycidol ergibt nicht ein Molekül 3-MCPD). Dies führte dazu, dass die DGF-Standard Methode C-VI 18 (09) zur Überarbeitung zurückgezogen wurde (vgl. Abschnitt 2.4.1).

In der überarbeiteten DGF-Standard Methode C-VI 18 (10) wird die nicht-stöchiometrische Umwandlung des Glycidols in eine stabilere Komponente durch die Ermittlung eines Transformationsfaktors (TF) berücksichtigt (vgl. Abschnitt 3.1.2). Dieser Methodenansatz setzt voraus, dass der zur Bestimmung des TF verwendete GE wie die in der Probe enthaltenen GE reagiert. Zudem muss das zur Matrixkalibrierung verwendete unbelastete Öl dieselben

Eigenschaften aufweisen wie die zu untersuchenden Proben. Anderenfalls ist eine exakte Quantifizierung des Glycidol-Gehaltes der Probe nicht gewährleistet. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Transformation des Glycidols in 3-MCPD - unter den Analysebedingungen der DGF-Methode CVI-18 (10) - abhängig von der Kettenlänge und dem Sättigungsgrad der Fettsäure des verwendeten GE ist. Für verschiedene GE lagen unterschiedliche TF vor (vgl. Absatz 4.1.1). Unter Verwendung von Glycidyl-Linolenat lag ein TF von 0,67 vor und entsprach damit in diesen Versuchen der stöchiometrisch vollständigen Umwandlungsrate von Glycidol in 3-MCPD. Vergleichbare Untersuchungen zu dieser Methode von Sato *et al.* (2013) mit Glycidyl-Oleat und Glycidyl-Stearat, das auf Sojaöl dotiert wurde, ergaben ebenfalls unterschiedliche TF abhängig vom verwendeten GE: Die Verwendung von Glycidyl-Oleat ergab einen TF von 1,21, die Verwendung von Glycidyl-Stearat einen TF von 1,00. In der Methodenvorschrift der DGF-Standard Methode C-VI 18 (10) wird Glycidyl-Stearat empfohlen. Stearinsäure ist jedoch in den meisten Speisefetten und -ölen zu wesentlich geringeren Anteilen enthalten als beispielsweise Öl- oder Linolsäure (vgl. Abbildung 2). Nachdem von Dubois *et al.* (2011) gezeigt wurde, dass die Struktur der GE mit dem Fettsäurespektrum der zu untersuchenden Proben korrespondiert, sollte bei der Auswahl des Kalibrierstandards das Fettsäurespektrum der zu untersuchenden Probe berücksichtigt werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte auch gezeigt werden, dass der TF abhängig von der verwendeten Blankmatrix ist. Hrncirik *et al.* (2011a) konnten zeigen, dass die Transformation des Glycidols bei Anwendung verschiedener indirekter Methoden pH-Wert abhängig ist. Neben dem pH-Wert und dem Fettsäurespektrum des Öls könnten der Gehalt an freien Fettsäuren, der Gehalt an Mono- und Diglyceriden sowie der Gehalt an organisch gebundenem Salz weitere Einflussfaktoren für die Transformation darstellen. Die Transformation der GE kann sich somit von Probe zu Probe unterscheiden. Die Auswahl einer geeigneten Blankmatrix für die Ermittlung des TF gestaltet sich damit als äußerst schwierig, da sie in ihren Eigenschaften den zu untersuchenden Proben möglichst ähnlich sein muss.

Die Transformation des Glycidols in Ansatz A der DGF-Methode CVI-18 (10) zu 3-MCPD verläuft bei allen drei getesteten GE unvollständig. Neben 3-MCPD wurden auch 8-9 mol % 2-MCPD gemessen. Das beweist, dass das freigesetzte Glycidol nicht vollständig zu 3-MCPD, sondern teilweise auch zu 2-MCPD umgesetzt wird. Auch in den Untersuchungen von Sato *et al.* (2013) konnte die Entstehung von 2-MCPD beobachtet werden, wenn Glycidyl-Oleat und Glycidyl-Stearat auf Sojaöl dotiert und unter den Analysenbedingungen des Ansatzes A behandelt wurden. In diesen Versuchen entstand 5,5-5,7 mol % 2-MCPD. Daraus folgt, dass die Quantifizierung über den TF nur dann korrekt ist, wenn auch die in der Probe vorliegenden GE im selben Umfang zu 2-MCPD umgesetzt werden.

Bei der DGF-Methode CVI-18 (10) wird gebundenes 3- und 2-MCPD in Ansatz B quantifiziert. Die Esterhydrolyse wird dort mit einer angesäuerten Natriumbromidlösung anstelle von NaCl abgestoppt, damit Glycidol sich nicht in zusätzliches 3-MCPD umwandelt. Ist in der Probe organisches Chlorid enthalten, ist nicht auszuschließen, dass aus dem freigesetzten Glycidol zusätzliches 3-MCPD (oder auch 2-MCPD) gebildet wird und damit das Ergebnis für gebundenes 3-MCPD verfälscht wird. Dies würde sich besonders bei den Proben auswirken, die hohe Glycidol- und niedrige MCPD-Gehalte aufweisen. Aufgrund der dargestellten Probleme bei der Quantifizierung wurde diese Methode zur Bestimmung von gebundenem MCPD und Glycidol in Säuglingsmilchnahrung nicht verwendet.

### 5.1.2 Direkter Nachweis

Der direkte Nachweis der GE hat gegenüber den indirekten Methoden den Vorteil, dass das gebundene Glycidol in der in der Probe vorliegenden Form gemessen wird. Dadurch werden Esterhydrolyse und Glycidoltransformation vermieden. Da im Gegensatz zu MCPD-Estern, die sowohl als Mono- und auch als Diester vorliegen können, nur Glycidyl-Monoester in den Proben vorkommen, ist die Anzahl möglicher Analyten hier deutlich niedriger; entsprechend werden weniger Standardsubstanzen benötigt. Pragmatisch betrachtet kann die Belastung von Speisefetten und -ölen mit 7 verschiedenen GE ausreichend ermittelt werden (Dubois 2011). Der direkte Nachweis liefert zudem Informationen über die Fettsäurezusammensetzung der Analyten. Da bisher kein zertifiziertes Referenzmaterial vorhanden ist, um die Richtigkeit von indirekten Methoden zu überprüfen, kann ein direkter Nachweis der GE zudem eine Möglichkeit der Überprüfung von indirekten Methoden sein.

Voraussetzung für den direkten Nachweis von GE ist eine sorgfältig durchgeführte Probenvorbereitung. Die GE müssen von den in der Probe in deutlich höheren Mengen vorliegenden Mono-, Di- und Triglyceriden separiert werden.

#### Untersuchungen zur Anwendung eines markierten internen Standards für die Kontrolle der Wiederfindung der LC-APCI-MS-Methode

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit als „Methode C“ bezeichnete LC-APCI-MS-Methode ist die erste publizierte Methode für den direkten Nachweis von GE (Masukawa *et al.* 2011). Mit einem zweifachen SPE-Verfahren werden die GE zunächst von den in den Proben vorkommenden Triglyceriden und anschließend von den Mono- und Diglyceriden separiert. Die Methode hat den Nachteil, dass pro Analyt nur eine Ionenspur gemessen wird. Die Bestätigung der Identität eines Analyten durch eine weitere Ionenspur ist nicht möglich. Matrixbe-



dingte Störsignale, die zeitgleich mit den Analyten eluieren, erschweren teilweise die Quantifizierung der Analyten. Die Quantifizierung erfolgt mit einer externen Standardkalibrierung in Lösungsmittel ohne IS. Etwaige Matrixeffekte, welche die Ionisation und damit die Wiederfindung der einzelnen GE beeinflussen können, werden dabei nicht berücksichtigt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden deshalb Glycidyl-Oleat-d<sub>5</sub>, Stearat-d<sub>5</sub>, Palmitat-d<sub>5</sub> und Linolenat-d<sub>5</sub> als interne Standards verwendet, um den Verlust der Analyten während der Probenaufarbeitung auszugleichen. Dazu wird angenommen, dass der deuterierte IS dabei dieselben chemischen Eigenschaften wie der jeweilige Analyt aufweist. Er wird in gleicher Konzentration zu jeder Probe und zu jedem Standard hinzugefügt und dient als relative Bezugsgröße. Die mit interner Kalibrierung (Standard in Lösungsmittel mit IS) ermittelten Ergebnisse wurden mit den Ergebnissen einer externen Kalibrierung verglichen (Tabelle 6). Die Blankölproben wurden mit gleichen Mengen GE und IS dotiert. Erwartungsgemäß lagen die ermittelten Wiederfindungsraten der internen Kalibrierung höher als bei Auswertung ohne IS. Die Unterschiede zwischen den einzelnen IS liegen im Bereich der Streuung von Analysenwerten. Möglicherweise würden höhere Wiederfindungsraten erzielt, wenn die Kalibrierung nicht mit Standardlösungen, sondern eine interne Kalibrierung mit Blankmatrix durchgeführt würde. Allerdings ist dabei die Auswahl der Blankmatrix ein kritischer Faktor; sie sollte den Analyten nicht enthalten (z.B. unraffiniertes Leinöl, Olivenöl), sollte jedoch in den sonstigen Eigenschaften (Fettsäurespektrum, Mono- und Diglyceridgehalt) den zu untersuchenden Proben ähneln.

Bei der Überarbeitung der Originalmethode von Masukawa *et al.* (2011) testeten Shiro *et al.* (2011a) die Verwendung eines selbstsynthetisierten internen Standards (Glycidol verestert mit Margarinsäure, C17:0, die in Speiseölen nur in Spuren vorkommt). Sie verglichen externe und interne Kalibrierung bei der Messung von vier Proben. Quantifiziert wurden fünf GE (Glycidyl-Oleat, -Palmitat, -Stearat, -Linoleat und -Linolenat) in vier Proben. Die 20 Messwerte lagen zwischen 0,31 und 12,7 mg/kg Öl; ein Wert lang unter der BG. Ihre Versuche ergaben, dass mit interner und externer Kalibrierung vergleichbare Wiederfindungsraten erzielt werden. Deshalb könne auf eine interne Kalibrierung verzichtet werden (Shiro *et al.* 2011a). Das genaue Verfahren der internen Kalibrierung ist nicht exakt beschrieben. Es ist nicht nachvollziehbar, bei welchem Schritt der IS zu den Proben zugegeben wurde. Je nach Zeitpunkt der Zugabe ist das Ergebnis unterschiedlich zu bewerten: Wird der IS vor der SPE zugegeben, deckt er den Verlust der Probenaufarbeitung mit ab. Wird der IS erst zu den aufgereinigten Probenlösungen nach dem SPE-Verfahren zugegeben, werden nur Verluste während der Messung korrigiert. Möglicherweise wurde das zweite Verfahren angewendet. Das könnte eine Erklärung dafür sein, dass kaum Unterschiede zwischen externer und inter-

ner Kalibrierung feststellbar wäre. Die Konzentration des IS GE-C17:0 lag mit 20 mg/kg Öl zudem deutlich über der Analytkonzentration in den Proben.

Dubois *et al.* bevorzugen für die direkte Bestimmung der GE mittels LC-MC/MS  $^{13}\text{C}$ -markierte IS zur Korrektur der Wiederfindung, da diese im Gegensatz zu deuterierten Verbindungen keine Retentionszeitverschiebungen zum unmarkierten Analyten aufzeigen (Dubois *et al.* 2011). Eventuelle Matrixeffekte auf das Analytsignal werden so besser korrigiert, da Analyt und IS zur selben Zeit ionisiert werden und denselben Ionisationsbedingungen unterliegen. Die Autoren verglichen externe und interne Kalibrierung mit der Quantifizierung über Standardaddition. Zur Standardaddition wurden sechs Konzentrationsstufen der GE auf den finalen Probenextrakt mit Hilfe des HPLC-Autosamplers dotiert. Die interne Kalibrierung wurde durch Dotierung der Probe (0,5 mg/kg IS direkt zur Probe vor der Aufreinigung zugegeben) erzielt. Nachteil der internen Kalibrierung ist, dass nicht für jeden Analyten ein isotoopenmarkierter IS verfügbar ist. Das Standardadditionsverfahren hat den Vorteil, dass Matrixeffekte der Probe im Vergleich zu anderen Verfahren am besten kompensiert werden. Jedoch sollte die Zugabe des Analyten in dem Konzentrationsbereich erfolgen, in dem die Belastung der zu untersuchenden Probe liegt. Die Zielkonzentration ist bei unbekannten Proben jedoch nicht vorhersehbar, sodass unter Umständen eine Wiederholung der Analyse nötig ist. Voraussetzung ist zudem die exakte Dosierbarkeit des Analyten und die genaue Kenntnis des linearen Bereichs der analytischen Methode für die jeweilige Matrix. Nachteil dieses Verfahren ist ferner die pro Probe erforderliche Messzeit (1,5 Stunden pro Probe), der hohe Verbrauch an Standardsubstanzen und die vergleichsweise aufwändigere Auswertung.

Der Verlust des Analyten während der Probenvorbereitung spielt bei der Analyse von GE eine entscheidende Rolle und sollte daher berücksichtigt werden. Ziel sollte es sein, praxistaugliche Verfahren hierfür zu entwickeln. Eine Möglichkeit wäre die Verwendung isotoopenmarkierter Standards für alle GE. Die Zugabe des IS in der Probe sollte dem Konzentrationsbereich der Probenbelastung entsprechen.

### Direkter Nachweis mit LC-MS/MS

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden GE-Messungen mit einem LC-Tandemspektrometer durchgeführt. Durch die Detektion substanzspezifischer Massenübergänge wird die Messung im Idealfall spezifischer und empfindlicher. Jedoch stellte sich die Messung mit LC-MS/MS (ESI) durch das Fehlen charakteristischer Hauptfragmente als vergleichsweise unempfindlich heraus. Es wurde deutlich, dass die GE sich zwar ionisieren lassen, das entstandene Fragmentierungsmuster jedoch mangels verwertbarer Produktionen eher ungeeignet für diese Art der Messung ist. Bei den meisten Produktionen handelt es sich um Fragmente der Fettsäureketten mit einer Massendifferenz von 14 des Alkanrestes  $\text{CH}_2$ . Die protonierten Molekülonen  $[\text{M}+\text{H}]^+$  wurden in der erarbeiteten MRM-Methode als Vorläuferion verwendet. Zur Quantifizierung diente deshalb der Übergang Vorläuferion auf das unfragmentierte Vorläuferion. Auswahlkriterium für die beiden weiteren Übergänge war eine möglichst hohe Masse sowie ein möglichst hohes Signal-Rausch-Verhältnis, da Übergänge mit niedrigem  $m/z$ -Verhältnis als unspezifisch bzw. störanfällig gelten. Bei Vergleichen der LC-APCI-MS-Methode (Methode C) mit der Messung der GE mit der entwickelten MRM-Methode können mit der Messung der GE im Q1 Multiple Ion-Mode wesentlich niedrigere Konzentrationen gemessen werden. In dem verwendeten LC-MS/MS Gerät kann die Kollisionsenergie auf minimal 5 eV reduziert werden, da eine Mindestspannung zur Beschleunigung der Ionen in den Q3 erforderlich ist. Dadurch wird ein Teil des Molekülonen immer fragmentiert und geht für die Messung des Übergangs verloren. Aufgrund der starken Fragmentierung der GE zeigten die ausgewählten Übergänge noch deutlich unempfindlichere Signale. Trotz geringerer Spezifität ist deshalb die LC-APCI-Methode für die direkte Bestimmung der GE besser geeignet.

Um vergleichbare Bestimmungsgrenzen mit Methode C zu erhalten, müsste der Probeneinsatz von 10 mg auf mindestens 200 mg erhöht werden, womit jedoch die Kapazität des Bettvolumens der SPE-Kartuschen überschritten wird, da die Abtrennung von Mono- und Diacylglyceriden dann nur noch unvollständig erfolgt (Masukawa *et al.* 2011). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden SPE-Kartuschen mit einem Bettvolumen von 1000 und 2000 mg (statt 500 mg in Methode C) getestet. Die Versuche ergaben, dass auch deren Limit mit maximal 100 mg Probe erreicht wird.

Auch Masukawa *et al.* (2011) stellten fest, dass die Messung der GE mit LC-MS/MS keine empfindlichen spezifischen Übergänge auf Fragmentionen liefert. Dubois *et al.* (2012) entwickelten eine Methode zur direkten Bestimmung von 7 GE mit LC-ToF-MS; für Routineanalysen verwendeten sie jedoch eine LC-MS/MS-Methode (ESI positiv) zur Quantifizierung. Als Vorläuferion diente ebenfalls das protonierte Molekölion  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Zur Quantifizierung wurde

für jeden GE der Übergang  $[M+H]^+ > m/z 57,1$  verwendet. Zur Bestätigung wurden die Übergänge auf  $[M+H]^+ > 71,1$  bei den GE, die mit gesättigten Fettsäuren verestert sind, sowie  $[M+H]^+ > 69,1$  für Glycidyl-Oleat (einfach ungesättigt), entsprechend  $[M+H]^+ > 67,1$  für Glycidyl-Linoleat (zweifach ungesättigt) und auch für Glycidyl-Linolenat (dreifach ungesättigt) verwendet. Diese Fragmentationen liegen deutlich unter  $m/z 100$ . Übergänge mit niedrigem  $m/z$ -Verhältnis sind erfahrungsgemäß unspezifisch bzw. störanfälliger als höhere  $m/z$ -Verhältnisse; das konnten auch die Autoren mittels hochauflösender Massenspektrometrie mit dem LC-ToF-MS-Gerät zeigen. Die hoch aufgelösten Daten zeigten, dass der Übergang auf  $m/z 57,1$  zwei unterschiedliche Quellen hat: Zum einen entsteht es als Glycidolprodukt  $[C_3H_5O]^+$ , zum anderen ist es das Produkt einer Alkanfragmentation  $[C_4H_9]^+$ . Der relative Anteil der beiden Produktionen ist Analyt-abhängig (Dubois *et al.* 2012). Um diesen Übergang zur Quantifizierung zu verwenden, muss das Verhältnis der beiden Fragmente in Probe und Kalibrierstandard identisch sein. Bei der Analyse verschiedener Matrices müssen die Daten daher kritisch betrachtet werden, zudem ist ein hohes Maß an Erfahrung mit dieser Analytik Voraussetzung für eine zuverlässige Quantifizierung.

Dubois *et al.* (2012) verwendeten für die Probenaufreinigung eine Kombination aus Gelpermeationschromatografie und Silika-Festphasenextraktion. Mit diesem Verfahren konnten 400 mg Fett eingesetzt werden. Die Bestimmungsgrenze wurde je nach GE auf 50-100  $\mu\text{g/kg}$  festgelegt. Damit ist das Verfahren zwar ebenso empfindlich wie Methode C, jedoch ist es ebenfalls zeit- und kostenaufwendig: Für die GPC-Aufreinigung werden pro Probe zwei Stunden sowie 150 ml Lösungsmittel benötigt. Die Messung dauert durch die Standardaddition 1,5 Stunden pro Probe. Die Methode wurde bisher nur für raffinierte Öle, nicht aber für fetthaltige Lebensmittel angewandt.

Becalski *et al.* (2012) entwickelten eine ähnliche LC-MS/MS-Methode mit nahezu denselben Übergängen wie die oben beschriebene LC-MS/MS-Methode. Für GE, die mit gesättigten Fettsäuren verestert sind, wurde ebenfalls der Übergang des protonierten Moleküls auf  $m/z 57$  verwendet. Das Fragmentation wurde hier dem Alkanfragment  $[C_4H_9]^+$  zugeordnet. Die Autoren verglichen Standardmessungen der MRM-Methode mit der Messung mit der LC-APCI-MS-Methode (AOCS 2012). Je nach Ester war auch hier die MRM-Methode um den Faktor 3-4 unempfindlicher als die SIM-Methode. Zur Probenaufreinigung wurden 10 mg Probe mittels Festphasenextraktion ähnlich dem der Methode C aufgearbeitet. Insgesamt bietet weder die Methode von Dubois *et al.* (2012) noch die Methode von Becalski *et al.* (2012) hinsichtlich Spezifität oder hinsichtlich Empfindlichkeit einen deutlichen Vorteil zur LC-APCI-MS-Methode.

---

### Direkter Nachweis mit GC-MS/MS

Für die direkte Bestimmung von GE mittels Gaschromatografie wurden bislang keine quantitativen Methoden publiziert. Lediglich ein qualitativer Nachweis konnte mit GC-MS erbracht werden (Weißhaar und Perz 2010). Zwar lassen sich GE gaschromatografisch analog zur Kettenlänge der veresterten Fettsäure trennen, jedoch kann keine Trennung der GE, die mit C18-Fettsäuren unterschiedlichen Sättigungsgrad verestert sind, erreicht werden. Die Messung von GE in Matrix mit GC-MS/MS stellte sich als unspezifisch heraus. Durch die starke Fragmentierung der Analyten, vermutlich schon in der Quelle, ist die Messung mittels GC-MS/MS bei analoger Probenvorbereitung wesentlich unempfindlicher als die LC-APCI-MS-Methode (Methode C) (AOCS 2012). Um vergleichbare Bestimmungsgrenzen zu erreichen, müsste deshalb wesentlich mehr Fett aufgearbeitet werden. Mit der von Dubois *et al.* (2011) verwendete GPC-Säule können maximal 800 mg Matrix aufgearbeitet werden. Für vergleichbare Bestimmungsgrenzen müssten jedoch mindestens 2,5 g Probenmaterial eingesetzt werden.

Nach Abschluss der Untersuchungen ergab sich ein Kontakt zu Frau Prof. Dr. Liliane Rueß (Arbeitsgruppe Ökologie an der Humboldt-Universität zu Berlin), die dasselbe GC-MS/MS-Gerät besitzt. Die Analytiker dort untersuchen Fettsäuren in Nematoden und Bodenproben. Sie mussten ebenfalls feststellen, dass die Quantifizierung von Fettsäuren, entgegen der Erwartungen und den Erfahrungen bei der Messung von Standards in Lösungsmittel, in Matrix mit dem GC-MS/MS-Gerät eine deutlich geringere Spezifität erreicht. Die starke Fragmentation der Fettsäuren resultiert hauptsächlich in Ionen mit geringen Massen, welche mit Matrixbestandteilen mit gleichen Übergängen zur selben Retentionszeit eluieren können (persönliche Mitteilung Prof. Dr. Liliane Rueß).

Der Vorteil flüssigkeitschromatografischer Verfahren ist, dass mit C18-HPLC-Säulen und isokratischer Elution mit Methanol eine Trennung der GE erreicht werden kann (Becalski *et al.* 2012; Masukawa *et al.* 2011; Dubois *et al.* 2011). Diese Trennung kann mittels GC nur mit sehr polaren Säulen erreicht werden, die jedoch nicht über 220°C geheizt werden können. Dadurch verbleiben später eluierende Matrixbestandteile auf der Säule, was auch durch Verwendung eines Backflush-System nicht vermieden werden kann. Bei der Flüssigchromatografie werden diese unerwünschten Matrixrückstände durch das Spülen der Säule mit Isopropanol (AOCS 2012; Dubois *et al.* 2011) bzw. durch anhaltendes Spülen der Säule mit Methanol nach jeder Messung (Becalski *et al.* 2012) entfernt. Die vergleichsweise sanftere Ionisierung der Analyten unter Atmosphärendruck resultiert zudem in einer weniger ausgeprägten Fragmentierung im Vergleich zur Ionisierung bei der Messung mit GC-MS. Dadurch

entstehen größere Fragmente, sodass MRM-Übergänge weniger störanfällig gegenüber coeluierenden Matrixbestandteilen sind.

#### Abschließende Betrachtung zum direkten Nachweis von GE in Säuglingsmilchnahrung

Ein Zugewinn an Spezifität kann weder mit der Messung mittels LC-MS/MS noch mittels GC-MS/MS erzielt werden. Die wesentlich empfindlichere LC-APCI-MS-Methode wurde in der Zwischenzeit in einer Methodenvvalidierungsstudie validiert. Es wurden 18 Proben (9 verschiedene Öle, doppelblind verschickt) untersucht, darunter Olivenöl (dotiert und undotiert), sowie raffiniertes Palm- und Rapsöl, Maiskeimöl und Sojaöl. Insgesamt nahmen 17 Labore an der Studie teil (Blumhorst *et al.* 2012).

Bisher gibt es keine Erkenntnisse darüber, ob sich das toxikologische Potential der GE abhängig von der Art der veresterten Fettsäure unterscheidet. Glycidol kommt in den Proben nur in gebundener und nicht in freier Form vor. Es muss also analytisch nicht unterschieden werden, ob das Glycidol verestert oder in freier Form vorliegt. Für Risikobewertung, amtliche Kontrollinstitutionen und Lebensmittelhersteller ist daher allein die Gesamtbelastung der Probe mit gebundenem Glycidol von Interesse. Die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit zeigen, dass mit der indirekten Analysenmethode B die Belastung von Proben mit gebundenem 3-MCPD, 2-MCPD und Glycidol verlässlich bestimmt werden kann. Direkte Analysenmethoden sind verglichen mit indirekten Methoden sehr aufwändig in Bezug auf Probenvorbereitung und Quantifizierung. Zudem werden vergleichsweise viele Standardsubstanzen benötigt. Die Versuche haben gezeigt, dass vermutlich für jeden Analyten zusätzlich ein isopenmarkierter IS für die Kontrolle der Wiederfindung notwendig ist, was die Analyse sehr kostenintensiv macht. Um die Belastung von Säuglingsmilchnahrung mit gebundenem Glycidol zu untersuchen, wurde deshalb die indirekte Analysenmethode B verwendet. Zur Absicherung der Ergebnisse wurden nur einige Proben mit der direkten LC-APCI-Methode (Methode C) untersucht. Da die beiden kurzkettigen Fettsäuren Laurinsäure (C12:0) und Myristinsäure (C14:0) die Hauptvertreter im Fettsäurespektrum von Palmkernöl und Kokosfett sind und mittlerweile die entsprechenden GE als Standardsubstanz kommerziell erhältlich sind, wurde die LC-APCI-MS-Methode im Rahmen der vorliegenden Arbeit um diese beiden Analyten ergänzt.

---

## 5.2 Methodenentwicklung zur Bestimmung von 3-MCPD- und 2-MCPD-Fettsäureestern in Human- und Ziegenmilch

Ziel der Methodenentwicklung war ein empfindliches und zuverlässiges quantitatives Verfahren, mit dem die Belastung an gebundenem 3-MCPD und 2-MCPD in Milchfett bestimmt werden kann. Bislang sind nur zwei Verfahren in der Literatur beschrieben: Der qualitative Nachweis von 3-MCPD-Estern in Ziegenmilch mittels Dünnschichtchromatografie (Cerbulis *et al.* 1984) und das quantitative Verfahren nach Zelinková *et al.* (2008) zur Untersuchung von Humanmilch.

### 5.2.1 Vergleich verschiedener Fettextraktionsmethoden

Zelinková *et al.* (2008) extrahierten das Milchfett aus jeweils 20 ml Humanmilch mit Dikaliumoxalat, Ethanol und Hexan-Diethylether. Dieses Extraktionsverfahren von Zelinková *et al.* (2008) ist in Bezug auf den Verbrauch an Lösungsmittel und den hohen Probeneinsatz von 20 ml Milch pro Bestimmung aufwendig. Für Mehrfachbestimmungen, bzw. für mögliche Wiederholungsmessungen wird eine entsprechend große Probenmenge benötigt. Um auch Frauen bei der Sammlung von Milchproben berücksichtigen zu können, die nur wenig Milch zur Verfügung stellen konnten, war eine Methode mit geringerem Probeneinsatz von Vorteil.

Die Extraktion des Milchfettes aus gefriergetrockneter Milch mittels ASE war nicht erfolgreich. Dabei wurden neben dem Milchfett zu viele unerwünschte Matrixbestandteile extrahiert, die die Chromatografie beeinträchtigten. Wiederfindungsraten von MCPD in einem großen Bereich von 69-170 % und Standardabweichungen von bis zu 34 % bei Mehrfachbestimmungen machten deutlich, dass die Quantifizierung ohne weitere Probenaufreinigung nicht möglich gewesen wäre.

Alternativ zum Verfahren von Zelinková *et al.* (2008) zur Flüssig-Flüssig-Extraktion des Milchfettes wurde der Ammoniak-Aufschluss nach Röse-Gottlieb getestet (Matissek *et al.* 2010). Die Fettausbeute war jedoch hierbei geringer. Deshalb wurde das Verfahren nach Zelinková *et al.* (2008) zur Fettextraktion optimiert. Allerdings wurden Probeneinwaage und Lösungsmittelmenge um den Faktor 4 reduziert. Dies erwies sich als praktikabel, da der komplette Extrakt weiterverarbeitet wurde und keine erneute Einwaage des Milchfettes notwendig war. In den meisten Milchproben lag der Fettgehalt über 2 %, so dass mindestens 100 mg Fett zur Verfügung standen.

### 5.2.2 Einfluss der Fettextraktion auf das Analysenergebnis

Um zu überprüfen, ob das beschriebene Verfahren zur Fettextraktion geeignet ist, die Analyten aus der Probe zu extrahieren, wurde Humanmilch in zwei Konzentrationsstufen mit MCPD-Estern und den jeweiligen IS vor und nach der Extraktion dotiert und die Ergebnisse verglichen. Die Ergebnisse der einfaktoriellen Varianzanalyse zeigen, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den ermittelten Gehalten in den Proben (Dotierung vor bzw. nach der Extraktion) besteht (Tabelle 8). In einem weiteren Versuch wurde die Extraktionsausbeute quantifiziert, indem Analyt direkt auf die Milch dotiert wurde und der IS zum einen vor der Extraktion direkt zur Milch, zum anderen nach der Extraktion auf das extrahierte Fett dotiert wurde (Tabelle 9). Die Extraktionsausbeute lag für beide Analyten über 50 %, wie es z.B. in der Richtlinie zur Qualitätssicherung der Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie gefordert wird (Paul und Mußhoff 2009). Damit wurde gezeigt, dass die Extraktionsmethode für die Analytik von MCPD-Estern in Milch geeignet ist.

### 5.2.3 Extraktaufreinigung und Kalibrierung

Wird der Fettextrakt nicht weiter aufgereinigt, enthält er neben den MCPD-Estern weitere Probenbestandteile, die die GC-MS-Analyse beeinträchtigen und das GC-MS-System bereits nach der Injektion weniger Proben stark beanspruchen. Deshalb wurde eine SPE-Methode als zusätzlicher Probenaufreinigungsschritt entwickelt, die das freigesetzte MCPD nach der Esterhydrolyse von der Matrix isoliert. Um den Verlust des Analyten über das gesamte Verfahren zu korrigieren, wurde der interne Standard zu Beginn der Analyse direkt zur Milch dotiert. Da mittlerweile einige isotoopenmarkierte 3- und 2-MCPD-Ester kommerziell erhältlich sind, wurde statt  $d_5$ -3-MCPD nun  $d_5$ -3-MCPD-Bispalmitoyl-ester verwendet. Als interner Standard für die Bestimmung von gebundenem 2-MCPD wurde  $d_5$ -1,3-Distearoyl-2-chloropropandiol verwendet. Der Vorteil des isotoopenmarkierten MCPD-Esters im Vergleich zur freien Form ( $d_5$ -3-MCPD,  $d_5$ -2-MCPD) ist, dass sie den Analyten strukturell entsprechen. Einer möglicherweise unvollständigen Esterhydrolyse sowie möglichen Umwandlungen während der Hydrolyse unterliegen sie theoretisch im selben Ausmaß wie die in den Proben vorliegenden MCPD-Ester. Dasselbe gilt für die zur Erstellung der Kalibriergeraden verwendeten Standardsubstanzen. Um die Vorgänge in der Probe bestmöglichst abzubilden, wurden zur Quantifizierung 3-MCPD-Bispalmitat und 2-MCPD-Distearat verwendet und eine Matrixkalibrierung mit Kuhmilch durchgeführt.



#### 5.2.4 Empfindlichkeit und Methodenvalidierung

Als Qualitätskontrolle diente in jeder Serie eine belastete Säuglingsmilchnahrung, die von mehreren Laboren im Rahmen der vom BfR organisierten Methodenvergleichsstudie mit unterschiedlichen Methoden analysiert wurde. Die Probe wurde entsprechend den Herstellerhinweisen zubereitet und die flüssige Milch in jeder Serie analog der Humanmilchproben analysiert; die Ergebnisse sind mit denen aus dem Ringversuch vergleichbar (Abbildung 26 im Anhang 6.8.2).

Die Methode wurde im Rahmen dieser Arbeit hinsichtlich Richtigkeit, Präzision und Wiederfindung validiert. Der lineare Arbeitsbereich wurde überprüft und Nachweis- und Bestimmungsgrenzen nach DIN ISO 32645 rechnerisch bestimmt (Anhang 6.8.2). Die Ergebnisse zeigen, dass trotz des geringeren Probeneinsatzes von 5 statt 20 ml Milch und einer aufwändigen Probenaufreinigung eine sehr empfindliche Methode zur Untersuchung von Humanmilchproben entwickelt werden konnte. Die Nachweisgrenzen von gebundenem 2-MCPD und 3-MCPD liegen bei 27 bzw. 63 µg/kg MilCHFett, die Bestimmungsgrenzen bei 51 bzw. 115 µg/kg MilCHFett. Damit ist die Methode deutlich empfindlicher als die Methode von Zelinková *et al.* (2008) mit einer Bestimmungsgrenze für 3-MCPD von 300 µg/kg MilCHFett.

Für Kontaminanten wie MCPD-Fettsäureester in Lebensmitteln gibt es bisher keine rechtlich festgelegten Kriterien zur Beurteilung der Qualität von Analysemethoden. Deshalb wurden die Kriterien der Entscheidung 2002/657 EG (Kapitel 2.3.2.1) bezüglich der Richtigkeit von quantitativen Methoden herangezogen. Die Richtigkeit der Messungen kann demnach durch Bestimmung der Wiederfindung von zugesetzten bekannten Mengen des Analyten zu einer Leerwertmatrix bestimmt werden, wenn keine zertifizierten Referenzmaterialien zur Verfügung stehen. Mit Werten zwischen 93 und 102 % sind die ermittelten Wiederfindungsraten zufriedenstellend (EG 2002). Lediglich für gebundenes 2-MCPD liegt die Wiederfindungsrate mit 116 % im niedrigen Konzentrationsbereich von 0,2 µg/kg gebundenem 2-MCPD etwas über dem Zielbereich von 80 bis 110 %, der für diesen Konzentrationsbereich angestrebt wird. Die Präzision der Methode ist mit Werten zwischen 1,30 von 3,92 %, ermittelt für die Konzentrationsbereiche für gebundenes MCPD von 0,2, 1,5 und 3,0 mg/kg Fett im Fünffach-Ansatz, ebenfalls zufriedenstellend.

Das Ergebnis der Methodenentwicklung ist demzufolge eine präzise und sensitive Methode, die geeignet ist, nicht nur 3-MCPD-Ester, sondern auch 2-MCPD-Ester in Milch zuverlässig zu quantifizieren. Durch die Verwendung isotoopenmarkierter MCPD-Ester, die zu Beginn der Analyse zugegeben werden, wird der Verlust des Analyten über das gesamte Verfahren berücksichtigt.

### 5.3 Methodenentwicklung Säuglingsmilchnahrung

Zur Ermittlung der Belastung von Säuglingsmilchnahrung mit gebundenem MCPD und Glycidol sind aufgrund der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse direkte Analysemethoden nicht geeignet (vgl. Absatz 5.1.2). Die indirekte DGF Einheitsmethode C-VI 18 (10) ist durch die Schwierigkeiten bei der Ermittlung des TF ebenfalls ungeeignet (vgl. Absatz 5.1.1).

Der von Ermacora und Hrncirik (2012) veröffentlichte Ansatz zur indirekten Bestimmung der drei Analyten in Speiseölen hat den Vorteil, dass die intakten GE in 3-MBPD-Ester umgewandelt werden und dadurch Glycidol zu Beginn der Analyse bereits in einen stabileren Analyten transformiert wurde. Unter sauren Bedingungen und Temperaturen von 50°C wird die Epoxidstruktur des Glycidols durch einen nukleophilen Angriff des Bromids geöffnet. Je nachdem, an welchem Kohlenstoffatom der nukleophile Angriff erfolgt, entstehen 2-MBPD- oder 3-MBPD-Ester. Durch die sterische Position der Fettsäure sowie dadurch, dass der nukleophile Angriff vorzugsweise am höher substituierten Kohlenstoffatom erfolgt, entstehen wesentlich mehr 3-MBPD-Ester als 2-MBPD-Ester (Verhältnis 19:1 und höher) (Ermacora und Hrncirik 2012 sowie eigene Untersuchungen). Nach der Säure-katalysierten Esterhydrolyse kann in einem Ansatz der Gehalt an gebundenem 3-MCPD, 2-MCPD und 3-MBPD (und damit Glycidol) bestimmt werden. Bisher wurde die Anwendung dieser Methoden nur bei der Untersuchung von Speisefetten und -ölen, nicht aber von fetthaltigen Lebensmitteln veröffentlicht.

#### 5.3.1 Untersuchungen zur Esterhydrolyse

Das BfR hat 2009 eine Methode zur Bestimmung von gebundenem 3-MCPD in Speisefetten und -ölen validiert (BfR-Methode 9). Die Esterhydrolyse erfolgt bei diesen Methoden alkalisch katalysiert. Seit die entsprechenden Standardsubstanzen käuflich zu erwerben sind, kann analog auch gebundenes 2-MCPD mit dieser Methode analysiert werden. Gebundenes Glycidol kann damit nicht bestimmt werden (Wöhrlin *et al.* 2011). Der Vorteil dieser Methode ist, dass für die alkalisch katalysierte Esterhydrolyse lediglich 5 bis 10 Minuten Inkubationszeit benötigt werden, während die Säure-katalysierte Esterhydrolyse über 16 Stunden erfolgt. Deshalb wurde getestet, ob die alkalisch katalysierte Esterhydrolyse der BfR-Methode 9 um die gleichzeitige Bestimmung von gebundenem Glycidol erweitert werden kann.

In einem ersten Versuch wurden ein belastetes Hartfett sowie eine Blankprobe, die mit gebundenem MCPD und gebundenem Glycidol dotiert wurde, mit BfR-Methode 9 und der Methode nach Ermacora und Hrncirik (2012) untersucht (Tabelle 10): Zunächst wurden alle Proben mit Natriumbromid-Schwefelsäure behandelt, so dass aus den GE 3-MBPD-Ester

entstehen. Anschließend wurde bei der einen Hälfte der Proben eine alkalisch katalysierte, bei der anderen Hälfte eine Säure-katalysierte Esterhydrolyse durchgeführt. Die Ergebnisse der alkalisch katalysierten Esterhydrolyse ergaben tendenziell höhere Ergebnisse. Eine Quantifizierung schien mit beiden Methoden möglich.

Bei Versuchen, bei denen 2-MCPD-Ester, 3-MCPD-Ester und GE einzeln auf Blanköl dotiert wurden, stellte sich bei der alkalisch katalysierten Esterhydrolyse heraus, dass 3-MBPD-Derivate auch in mit Natriumbromid vorbehandelten Proben entstehen, zu denen ursprünglich kein gebundenes Glycidol gegeben wurde. Dies ist bei der Säure-katalysierten Esterhydrolyse nicht der Fall. Da die Proben bis zum Schritt der Esterhydrolyse gleich behandelt wurden, muss die Art der Esterhydrolyse für die unerwünschte Bildung von 3-MBPD-Derivaten verantwortlich sein.

Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass das in der Probe enthaltene gebundene MCPD im alkalischen Milieu instabil ist (Kuhlmann 2011b; Hrnčirik *et al.* 2011b). In Anwesenheit von Natriummethylat wird aus Alpha-Halohydrinen wie 2- und 3-MCPD durch intramolekulare Substitution Glycidol gebildet (Ketola *et al.* 1978). Mit Bromidionen entsteht daraus teilweise 3-MBPD.

Die Wiederfindung für gebundenes 2-MCPD bzw. 3-MCPD bei der alkalisch katalysierten Esterhydrolyse betrug bei den dotierten Proben 100 bzw. 110 %. Die Ergebnisse in Tabelle 10 zeigen zudem, dass die Quantifizierung durch die Instabilität des MCPD im alkalischen Milieu kaum beeinträchtigt wird. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass der jeweilige IS dieselben Umwandlungsreaktionen durchläuft und im selben Ausmaß andere Substanzen entstehen. Unter der Voraussetzung, dass der IS sich in der Probe exakt wie der Analyt verhält, wird die Richtigkeit der Ergebnisse dadurch nicht beeinflusst. Dennoch könnte durch die Degradation des MCPDs die Empfindlichkeit dieser Methoden beeinflusst werden.

Die mögliche Bildung von 3-MBPD-Derivaten aus Nicht-Glycidol-Vorstufen ist in diesem Fall schwer zu kontrollieren und auch nicht quantifizierbar. Sie ist möglicherweise abhängig von Probenmatrix und Art der Fettsäuren, die mit den Analyten verestert sind.

Vergleicht man das Signalverhältnis 3-MBPD zu 2-MBPD bei den Proben, zu denen Glycidol dotiert wurde, so beträgt dieses bei der Säure-katalysierten Esterhydrolyse bei Proben und Kalibrierstandards etwa 19-20, bei der alkalisch katalysierten Esterhydrolyse 2 bis maximal 6. Das bedeutet, dass während der alkalischen Hydrolyse ein wesentlich größerer Teil des Glycidols in 2-MBPD umgewandelt wird. Wenn auch aus den Kalibrierstandards im selben Ausmaß 2-MBPD entsteht, hat das zwar einen Einfluss auf die Empfindlichkeit, nicht jedoch auf das eigentliche Analysenergebnis.

Aufgrund der Instabilität der Analyten im alkalischen Milieu sowie dem bezüglich der Empfindlichkeit ungünstigeren Verhältnis 3-MBPD zu 2-MBPD, wurde die Säure-katalysierte Esterhydrolyse nach Umwandlung der GE in 3-MBPD-Ester zur Untersuchung der Säuglingsmilchnahrung verwendet.

### 5.3.2 Fettextraktion und Kalibrierung

Da die meisten Untersuchungen für die Bestimmung von GE bisher mit Speiseölen erfolgten, stehen geeignete Fettextraktionsverfahren für die Untersuchung fetthaltiger Lebensmittel bisher nicht im Vordergrund der Forschung. Zelinková *et al.* (2009) untersuchten 14 Proben von Säuglingsmilchnahrung hinsichtlich deren Belastung mit 3-MCPD-Estern. Das Analysenverfahren entspricht dabei dem Verfahren, das bei der Analytik der Humanmilchproben angewendet wurde (Zelinková *et al.* 2008). Hierfür wurde das Säuglingsmilchpulver nach Herstellerangaben zubereitet und die flüssige Milch mit dem oben beschriebenen Verfahren analysiert. Wie bereits diskutiert, ist dieses Verfahren aufwendig in Bezug auf Arbeitszeit und Lösungsmittelverbrauch.

Für die Fettextraktion von MCPD- und Glycidylestern wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine ASE-Methode entwickelt (vgl. Abschnitt 4.5.2). Bei vergleichsweise geringem Verbrauch an Lösungsmittel können durch die Automatisierung bis zu 24 Proben über Nacht extrahiert werden. Es wurde geprüft, ob die Methode mit Temperaturen von 100°C und hohen Drücken für die Extraktion der Analyten geeignet ist. Insbesondere für GE war vor den Versuchen unklar, ob die Epoxidstruktur stabil ist. Die Versuche ergaben, dass die ASE-Extraktion keinen Einfluss auf den Gehalt der Analyten hat (vgl. Abschnitt 4.5.3).

Für die Matrixkalibrierung wird in der Regel eine Leerprobe verwendet, die den Analyten nicht oder nur in sehr geringen Mengen enthält. Blankmaterial zur Matrixkalibrierung war nicht verfügbar, da in jeder untersuchten Säuglingsmilchnahrung sowie in alternativen Matrices wie Milchaustauscher für Kälber und Kaffeeweißer alle drei Analyten nachweisbar waren. Einzig verfügbare Blankmatrix ist derzeit unraffiniertes Leinöl. Vergleicht man eine Matrixkalibrierung mit Leinöl mit einer Standardkalibrierung ohne Öl, so ergeben sich keine Unterschiede bezüglich der Steigung (vgl. Abschnitt 4.5.4). Die Wiederfindung von dotierten Proben ist mit einer Standardkalibrierung ebenfalls zufriedenstellend (vgl. Abschnitt 6.8.1). Deshalb wurde bei dieser Analysenmethode auf eine Matrixkalibrierung verzichtet.

### 5.3.3 Empfindlichkeit und Methodvalidierung

Die Methode wurde inhouse validiert. Die Ergebnisse der Methodvalidierung sind in Abschnitt 6.8.1 aufgeführt; die getesteten Parameter lieferten zufriedenstellende Ergebnisse. Die Wiederfindungsraten sowie die Präzision innerhalb eines Tages und unter Zwischenbedingungen (an zwei Tagen) entsprechen den Anforderungen für eine quantitative Analysenmethode (EG 2002). Die ursprünglich von Ermacora und Hrncirik (2012) über das Signal-Rausch-Verhältnis in Ölproben ermittelten Nachweisgrenzen von 40 µg/kg für gebundenes MCPD bzw. 60 µg/kg für gebundenes Glycidol konnten für das extrahierte Fett aus der Matrix Säuglingsmilchnahrung im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden. Für die Ermittlung der Grenzen über das Signal-Rausch-Verhältnis gibt es keine genauen Vorgaben. So ist beispielsweise nicht klar formuliert, in welchem Bereich das Signalrauschen gemessen wird. Oft werden die Grenzen bei diesem Verfahren in Standardlösung ermittelt und somit der Einfluss der Matrix auf die Nachweisgrenze vernachlässigt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das Verfahren der Leerwertmethode in der komplexen Matrix Säuglingsmilchnahrung nach DIN 32 645 vorgezogen. Auch die Bestimmungsgrenzen für Fett von Säuglingsmilchnahrung (126 µg/kg Milchfett für gebundenes 2-MCPD, 190 µg/kg Milchfett für gebundenes 3-MCPD und 148 µg/kg Milchfett für gebundenes Glycidol) liegen nach den vorliegenden Untersuchungen im selben Bereich wie die nach Ermacora und Hrncirik (2012) in Speisefetten und -ölen (140 µg/kg für gebundenes MCPD und 190 µg/kg für gebundenes Glycidol). Damit ist die erweiterte Methode in der Matrix Säuglingsmilchnahrung ebenso leistungsfähig wie in Speiseölproben.

Als Qualitätskontrolle diente in jeder Serie eine belastete Probe Säuglingsmilchnahrung, die von mehreren Laboren im Rahmen der vom BfR organisierten Methodenvergleichsstudie mit unterschiedlichen Methoden analysiert wurde. Die mit dieser Methode erzielten Ergebnisse entsprechen den im Ringversuch ermittelten Gehalten (vgl. Abbildung 25, Anhang 6.8.1).

## 5.4 Vergleich der direkten und indirekten Methoden

Ein Teil der Säuglingsmilchproben wurden mit der LC-APCI-MS-Methode (Methode C) auch direkt auf den Gehalt der GE untersucht (Tabelle 14). In Tabelle 15 sind die Ergebnisse beider Methoden für die Untersuchung von 7 Speiseölen dargestellt (direkt Methode C, indirekt Methode B). Aus dem Gehalt der einzelnen GE wurden über das Molekulargewicht die Glycidol-Äquivalente berechnet. Da nicht für alle GE ein isotopenmarkierter IS vorhanden war, wurde keine Wiederfindungskorrektur durchgeführt.

Die BG der indirekten Methode liegt bei 148 µg/kg Fett (siehe Anhang 6.8.1). Die Nachweis- und BG der LC-APCI-MS-Methode wurden im Rahmen dieser Arbeit über das Signal-Rausch-Verhältnis ermittelt (siehe Anhang 6.8.3). Für vier der sieben getesteten GE ergab sich eine BG von etwa 40 µg GE pro kg Öl. Das entspricht etwa 10 µg Glycidol pro kg Fett. Die BG für Glycidyl-Stearat ist wesentlich höher, die BG für Glycidyl-Oleat und -Linoleat etwas niedriger.

Vergleicht man die direkt und indirekt ermittelten Glycidol-Gehalte der Säuglingsmilchproben, so lagen die Gehalte, die mit der indirekten Methode ermittelt wurden, über den direkt bestimmten Gehalten. Dies ist teilweise mit dem Verlust der Analyten während der Probenaufarbeitung zu erklären. Auffällig waren jedoch die Proben der Handelsmarke C, bei denen der direkt bestimmte Glycidol-Gehalt nur 14-48 % der indirekt ermittelten Gehalte entsprach. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass in Produkten dieses Herstellers mehr GE enthalten sind, für die es keine GE-Standards gibt und die dadurch nicht erfasst wurden. Würden z.B. Kokos- oder Palmkernfett verwendet, die reich an den kurzkettigen Fettsäuren Capryl- und Caprinsäure (C8:0, C10:0) sind, würde Glycidol, das mit diesen beiden Fettsäuren verestert ist, nicht miterfasst werden. Auch für langkettige, mehrfach ungesättigte Fettsäuren (LC-PUFA) gibt es keine GE-Standardsubstanzen. Hier wäre die Untersuchung des Fettsäurespektrums der Proben aufschlussreich.

Die Abweichung zwischen direkter und indirekter Nachweismethode ist besonders in den Proben hoch, die vergleichsweise niedrig belastet sind, was eher auf eine höhere Messunsicherheit im Bereich der Bestimmungsgrenzen beider Methoden hinweist. Möglicherweise liegt der Gehalt einzelner GE, die direkt bestimmt wurden, unter der jeweiligen Nachweisgrenze. Für diese These sprechen auch die Analysenergebnisse der Ringversuchsproben, die vergleichsweise hoch belastet waren (Tabelle 15). Hier betrugen die direkt bestimmten Glycidol-Gehalte 78-100 % der indirekt ermittelten Gehalte. Ausnahme war auch hier eine sehr niedrig belastete Probe. Hier wurde mit der direkten Methode 0,09 mg/kg bestimmt, mit der indirekten Methode 0,15 mg/kg. Die Abweichung zwischen beiden Verfahren lag damit bei 60 %. Die Aussagekraft dieser Ergebnisse ist jedoch eingeschränkt, da es sich um Ringversuchsproben handelt, deren Eigenschaften wie Ölsorte oder Fettsäurespektrum den Studienteilnehmern nicht bekannt sind. Es ist zu vermuten, dass Proben auch dotiert wurden, was in vorangegangenen Ringversuchen der Fall war (Blumhorst *et al.* 2012); in Probe 1 stimmten beispielsweise die direkt und indirekt ermittelten Gehalte sehr gut überein (Abweichung 2 %) und jeder untersuchte GE war in vergleichbaren Konzentrationen nachweisbar. Die Proben 2 und 5 enthielten die fünf GE, für die die Methode ursprünglich validiert wurde (AOCS 2012). Die Abweichung zwischen direkt und indirekt betrug auch hier nur 7 bzw. 0 %.

Untersuchungen zur Vergleichbarkeit von direkten und indirekten Methoden zur Quantifizierung von GE sind derzeit nur für Palmölproben vorhanden (Kuhlmann 2011b). Der Gehalt wurde zum einen direkt mit der LC-MS/MS-Methode (7 GE) von Dubois *et al.* (2011) nach GPC und SPE-Aufreinigung gemessen. Zum anderen wurde eine indirekte Methode mit alkalisch katalysierter Esterhydrolyse und Transformation des freigesetzten Glycidols in 3-MBPD angewendet (Kuhlmann 2011a). Die Ergebnisse zeigten eine gute Korrelation, die direkt ermittelten Gehalte waren etwas niedriger als die indirekt ermittelten Gehalte. Die Abweichung war jedoch hier umso größer, je höher die Probenbelastung war. Eine mögliche Erklärung ist, dass die höher belasteten Palmölproben einen oder mehrere GE, die mit kurzkettigen Fettsäuren verestert sind, in höheren Mengen enthalten, die wiederum mit der direkten Methode nicht erfasst werden. In 3 der 10 untersuchten Proben wurde mit beiden Methoden kein gebundenes Glycidol quantifiziert. Die übrigen Proben wiesen vergleichsweise hohe Gehalte von circa 0,8 bis 4,2 mg/kg auf (Kuhlmann 2011b).

Crews *et al.* (2012) ziehen auf der Basis der bisher publizierten Methoden den Schluss, dass die direkte Bestimmung der GE den indirekten Methoden vorzuziehen ist, da die Analysenergebnisse nicht durch etwaige Probleme bei der Transformation des Glycidols oder die Derivatisierung beeinträchtigt werden. Die Vergleichbarkeit publizierter Methoden ist jedoch schwierig zu beurteilen, da diese in der Regel nur inhouse und nur für Ölproben, nicht aber für komplexe Matrices wie Säuglingsmilchnahrung validiert worden sind. Nachweis- und Bestimmungsgrenzen werden oft mit unterschiedlichen Methoden bestimmt und sind zudem abhängig von den jeweils verwendeten Analysengeräten. Zu beachten ist auch, dass die Gesamtmessunsicherheit der Methoden sich bei den direkten Verfahren aus der jeweiligen Messunsicherheit für die einzelnen Ester zusammensetzt und damit schwer zu schätzen ist. Für die Anwendung indirekter Methoden spricht neben der höheren Empfindlichkeit, dass das Messergebnis die Gesamtmenge der toxikologisch relevanten Komponenten darstellt. Weiterer Vorteil ist, dass weniger Standardsubstanzen notwendig sind und die Probenvorbereitung in analytischen Laboren ohne spezielle Ausrüstung (SPE-Kartuschen, GPC-Säule) durchführbar ist.

Bislang ist die Datenlage zum Vergleich beider Methodenansätze nicht ausreichend. Für aussagekräftige Ergebnisse sollten vorrangig unterschiedliche Realproben über einen breiten Konzentrationsbereich mit den in Frage kommenden Methoden gemessen werden.

## 5.5 Ergebnisse der Untersuchung von Human- und Ziegenmilch

Der Fettgehalt von Humanmilch ist individuell sehr unterschiedlich und verändert sich während der Brustmahlzeit. Der Fettgehalt der untersuchten Proben variierte zwischen 0,99 und 5,45 %. Der Mittelwert  $\pm$  SD betrug  $2,64 \pm 1,12$  % der Medianwert betrug 2,55 %. Die Fettgehalte der untersuchten Humanmilchproben in Tschechien lagen zwischen 1,7 und 7,2 % (Mittelwert: 3,80 %) und waren damit etwas höher (Zelinková *et al.* 2008).

In den im Rahmen dieser Promotionsarbeit untersuchten Humanmilchproben von 24 Müttern konnte bei einer NG von 63  $\mu\text{g/kg}$  Fett kein gebundenes 3-MCPD und ebenso kein gebundenes 2-MCPD (NG 27  $\mu\text{g/kg}$ ) nachgewiesen werden. Entsprechend errechnet sich für gestillte Kinder in Deutschland eine aktuelle tägliche Exposition von weniger als 0,38  $\mu\text{g}$  3-MCPD bzw. 0,16  $\mu\text{g}$  2-MCPD pro kg KG, deutlich unterhalb des TDI-Wertes für 3-MCPD von 2  $\mu\text{g/kg}$  KG (Verzehrsannahme: 160 ml/kg KG, Fettgehalt 3,75 %).

Diese Ergebnisse stehen im Kontrast zu denen von Zelinková *et al.*, die im Jahr 2008 über Gehalte von gebundenem 3-MCPD in 10 von 12 Humanmilchproben berichteten, der Mittelwert betrug 1,014 mg/kg Fett (Range 0,471 bis 2,195 mg/kg Fett, zwei Proben unterhalb der BG von 0,3 mg/kg Fett) (Zelinková *et al.* 2008). Für diese Diskrepanz gibt es keine einfachen Erklärungen. Bisher wurden die Ergebnisse von Zelinková *et al.* (2008) von keiner anderen Arbeitsgruppe bestätigt.

Theoretisch möglich ist ein analytisches Problem bei den damaligen Untersuchungen. Allgemein gilt die von der tschechischen Arbeitsgruppe verwendete Analysenmethode (Säure-katalysierte Esterhydrolyse) jedoch als zuverlässig; im Gegensatz zur alkalisch katalysierten Esterhydrolyse ist nahezu auszuschließen, dass 3-MCPD während der Analysen gebildet wird (Hrncirik *et al.* 2011a).

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Methode zur Bestimmung der MCPD-Ester in Milch ist empfindlicher als die von Zelinková *et al.* (2008) verwendete Methode; sie wurde ausführlich getestet und hinsichtlich Präzision und Wiederfindung validiert. Der Verlust des Analyten wird durch die Verwendung eines markierten IS über das gesamte Verfahren abgedeckt. Zudem wurden einige Proben zusätzlich mit einer zweiten Methode analysiert, in der die Esterhydrolyse wie bei Zelinková *et al.* (2008) Säure-katalysiert erfolgte. Dass in Human- und Ziegenmilch kein gebundenes MCPD detektiert werden konnte, kann daher nicht mit methodischen Abweichungen begründet werden.



Die Belastung der Nahrung mit MCPD-Fettsäureestern könnte in den vergangenen Jahren stark zurückgegangen sein. Ein solcher Rückgang müsste aber überschlägig in der Größenordnung von Faktor 10 liegen; für einen derartigen starken Rückgang der Belastung der Nahrung als Folge der eingeleiteten Reduzierungsmaßnahmen gibt es keinen Hinweis. Die Ergebnisse der Befragung der Mütter während der aktuellen Studie zu ihrem Ernährungsverhalten zeigen, dass diese in durchschnittlichem Maße Lebensmittel mit raffinierten Fetten verzehrt haben (Abschnitt 4.3 und Abschnitt 6.3 im Anhang). Zudem wurden in den zwei Proben aus dem Jahr 2003, die vom Lehrstuhl für Ernährungsphysiologie in Jena aus einer älteren Studie zur Verfügung gestellt wurden, ebenfalls keine MCPD-Ester gemessen. Damals war das Problem der MCPD-Ester in Lebensmitteln noch unbekannt. Theoretisch denkbar ist auch eine – zumindest vor mehreren Jahren – in Tschechien besonders hohe Belastung der Lebensmittel mit gebundenem 3-MCPD. Es liegen keine publizierten Daten vor, die diese These stützen würden.

Grundsätzlich ist die Frage zu stellen, als wie plausibel die Möglichkeit einer Aufnahme und Speicherung von MCPD-Fettsäureestern im Organismus anzusehen ist. Zunächst einmal ist davon auszugehen, dass auch beim Menschen während der Verdauung der überwiegende Teil der 3-MCPD-Fettsäureester intestinal hydrolysiert wird und 3-MCPD in fast gleichem Maße im Organismus bioverfügbar wird wie bei der Applikation der gleichen molaren Menge freies 3-MCPD. Dies konnte bei Studien mit 3-MCPD-Dipalmitat bei Ratten gezeigt werden (Abraham *et al.* 2013; Barocelli *et al.* 2011). Zu mehreren Zeitpunkten nach der Applikation konnte der Ester selbst jedoch nicht in Blut, Leber, Niere oder Fettgewebe nachgewiesen werden (Abraham *et al.* 2013). Nicht ausgeschlossen werden kann somit nur, dass ein sehr kleiner Teil der Dosis eines 3-MCPD-Fettsäureesters direkt in den Körper aufgenommen wird. Mit Blick auf die Erkenntnisse zur Fettverdauung ist festzustellen, dass Mono-, Di- und Triglyceride i.d.R. nicht intakt resorbiert werden (Rehner und Daniel 2002).

Die Höhe der Gehalte an gebundenem 3-MCPD im Fett der Humanmilch bei der Untersuchung von Zelinková *et al.* (2008) liegen in der gleichen Größenordnung wie die Gehalte in raffinierten Speisefetten. Der Ursprung der Gehalte in Humanmilch kann daher nicht ausschließlich eine der letzten Mahlzeiten der Mutter sein, da davon auszugehen ist, dass eventuell aufgenommene 3-MCPD-Fettsäureester sich im Körperfett verteilen und entsprechend verdünnen. Daher macht die bei der tschechischen Untersuchung gefundene Höhe der Gehalte nur Sinn, wenn ein nicht unwesentlicher Teil der Menge an verzehrtem 3-MCPD-Ester in den Körper aufgenommen und gespeichert wird.

Auch wenn ein solches Phänomen bei den genannten Untersuchungen an Ratten (Abraham *et al.* 2013) nicht beobachtet wurde, sind theoretisch bedeutende Spezies-Unterschiede bei

der Resorption denkbar. In diesem Zusammenhang sind zunächst Untersuchungen aus den 1980er Jahren zu erwähnen, bei denen 3-MCPD-Diester mit Dünnschichtchromatographie in zwei Ziegenmilch-Poolproben qualitativ nachgewiesen wurden, nicht aber in Kuhmilch und Butter (Cerbulis *et al.* 1984; Kuksis *et al.* 1986). Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen konnte in den 14 untersuchten Ziegenmilchproben weder gebundenes 2-MCPD noch 3-MCPD nachgewiesen werden. Eine Erklärung für diese Diskrepanz könnte in der im Vergleich zu heute weniger ausgereiften analytischen Methodik liegen. Möglich ist aber auch, dass die Ziegen auf dem BfR-Versuchsgut nicht gegenüber 3-MCPD-haltigen Futtermitteln exponiert waren; sie werden für Versuchszwecke unter optimalen Bedingungen gehalten und ihren Bedürfnissen entsprechend gefüttert (Mailssilage, Heu, Stroh, Hafer, Diffusionsschnitzeln und Mineralfutter). Diese Faktoren sind bei den Ziegen aus den Untersuchungen von Cerbulis *et al.* (1984) nicht beschrieben. Da Ziegen Allesfresser sind, die z.B. auch Pellets akzeptieren, ist nicht auszuschließen, dass in den 1980er Jahren auch Fettreste der Lebensmittelherstellung verfüttert wurden und gebundenes 3-MCPD über das Futter in den Körper und dadurch in die Milch gelangte.

Bei der Ziegenmilch-Untersuchung aus den 1980er Jahren berichteten die Autoren zudem, dass das Fettsäureprofil der 3-MCPD-Ester dem endogenen Fettsäureprofil entsprach; gleiches berichteten sie über qualitativ in Humanmilch nachgewiesene 3-MCPD-Diester (Kuksis *et al.* 1986). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass 3-MCPD-Ester bei einigen Spezies endogen (re-)synthetisiert werden, ausgehend von (hydrolysiertem) 3-MCPD und in Analogie zu Glycerin, aus dem in den Enterozyten Mono-, Di- und Triglyceride (re-)synthetisiert werden. Darüber, ob dies im Stoffwechsel der Darmzellen tatsächlich möglich ist, kann nur spekuliert werden.

Insgesamt sind in Hinblick auf das mögliche Vorkommen von MCPD-Estern in Säugetiermilch viele Fragen offen, die nur durch weitere Untersuchungen zu klären sind.

## **5.6 Gehalte in Säuglingsmilchnahrung und Schätzung der Exposition von Säuglingen**

### **5.6.1 Fettgehalt der Proben.**

Die DiätV schreibt vor, dass in 100 kcal der zubereiteten Säuglingsmilchnahrung mindestens 4,4 g Fett enthalten sein müssen (DiätV 2010). Auf jeder Packung ist der Kaloriengehalt pro 100 ml zubereitetes Produkt angegeben. Die mittels ASE bestimmten Fettgehalte im Milchpulver lagen überwiegend im Bereich des auf der Packung deklarierten Fettgehaltes. In eini-

gen Proben unterschritt der ermittelte Fettgehalt den deklarierten Fettgehalt allerdings um fast 30 %. Berechnet man den Fettgehalt auf 100 kcal zubereitetes Produkt, so lag dieser in 15 Proben leicht unterhalb der Vorgabe (Minimum 3,61 g Fett pro 100 kcal). Auffällig waren alle fünf Proben der 1-Nahrung C, sie enthielten weniger als 4,4 g Fett pro 100 kcal. Vier 1-Nahrungen und drei Pre-Nahrungen der Handelsmarke D sowie drei 1-Nahrungen der Handelsmarke E lagen unter den von der DiätV geforderten 4,4 g Fett pro 100 kcal.

Eine Erklärung dafür, dass in einigen Proben niedrigere Fettgehalte ermittelt wurden als auf der Packung angegeben, könnten Unterschiede bei der Herstellung sein. Die meisten pulverförmigen Säuglingsmilchnahrungen werden durch Sprühtrocknung hergestellt. Das heißt, das flüssige Produkt wird zerstäubt und durch Kontakt mit heißer Luft getrocknet. Das Fett oder Öl ist in Form von Tropfen in Partikeln durch die Matrix verkapselt (Sharma *et al.* 2012). Bei der Fettextraktion muss die Verkapselung aufgebrochen werden. Geschieht dies unvollständig, kann eventuell nur das freie Fett an der Oberfläche bzw. in den vom Lösemittel zugänglichen Kapillaren erreicht werden. Die Verkapselungseffizienz ist unter anderem von den Sprühtrocknungstemperaturen abhängig. Möglicherweise hat dieser Grad der Verkapselung einen Einfluss auf die Effektivität der entwickelten Fett-Extraktionsmethode. Die Überprüfung der Einhaltung der Fettgehalte war jedoch nicht Ziel dieser Arbeit. Da der nach DiätV vorgeschriebene Fettgehalt der Produkte auf den Kaloriengehalt und nicht auf das Pulver an sich bezogen wird, müsste für eine Überprüfung auch der Kaloriengehalt mitbestimmt werden.

### 5.6.2 Gebundenes 3-MCPD

Die Ergebnisse für gebundenes 3-MCPD in Säuglingsmilchnahrung zeigen mit einer mittleren Belastung von 0,416 mg/kg Fett (Median 0,413 mg/kg Fett,  $n = 70$ ) eine im Vergleich zu den in den Vorjahren publizierten Untersuchungsergebnissen deutliche Reduktion der Gehalte. Die ersten Daten des CVUA Stuttgart für Deutschland aus dem Jahr 2007 hatten einen Median von 2,57 mg/kg Fett (zitiert in BfR 2007, mögliches mit erfassen von Glycidol) ergeben, Folgeuntersuchungen des Amtes aus den Jahren 2009 und 2010 eine Belastung von circa 2 mg/kg Fett ( $n = 40$ , Weißhaar 2011; BfR 2012). Aufgrund methodischer Schwierigkeiten (Differenzmethode) können diese Werte nur als Abschätzung gewertet werden. Zelinková *et al.* (2009) analysierten 14 Säuglingsmilchnahrungen aus Supermärkten in Prag. In den 6 Proben Anfangsnahrung (je 2 Proben von 3 verschiedenen Herstellern) wurde ein mittlerer Gehalt an gebundenem 3-MCPD von 1,39 mg/kg Fett ermittelt (Range: 1,04 – 2,03 mg/kg Fett). Inwieweit in Deutschland und Tschechien ähnliche Maßstäbe an die Bemühungen zur Reduktion der Gehalte gelegt werden, ist nicht bekannt.

Offenbar ist es den Herstellern von Säuglingsmilchnahrung in Deutschland in den zurückliegenden Jahren durch geeignete Maßnahmen gelungen, die Gehalte deutlich abzusenken. Bei Zugrundelegung der Rechenbasis der Risikobewertung des BfR aus dem Jahr 2007 (Trockenpulver 15 g/100 ml trinkfertige Milch, 25 % Fettanteil im Milchpulver, Verzehr 160 ml/kg KG, vollständige Hydrolyse bei der Verdauung) ergibt sich für die ermittelten aktuellen Gehalte als Schätzung für nicht-gestillte Säuglinge eine mittlere tägliche Aufnahme von 2,50 µg/kg KG, die nur noch gering über dem TDI-Wert von 2 µg/kg KG und deutlich unterhalb der initial vom BfR (2007) geschätzten Exposition von 15,4 µg/kg KG liegt. Eine solche Schätzung (auf Basis der gleichgewichteten Mittelwerte aller 7 untersuchten Marken) bei fehlender Kenntnis der Marktanteile erscheint bei relativ geringen Differenzen der verschiedenen Marken legitim. Wird von einer hohen Markentreue ausgegangen, errechnet sich die höchste Exposition mit 3,40 µg/kg KG für Säuglinge mit Verzehr der Marke E (Mittelwert 0,567 mg/kg Fett). Um den TDI-Wert nicht zu überschreiten, muss der durchschnittliche Gehalt bei der genannten Rechenbasis unterhalb von 0,33 mg/kg Fett liegen. Dieser Wert wurde bei den aktuellen Untersuchungen bereits von der Marke C unterschritten (Mittelwert 0,294 mg/kg Fett, vgl. Abbildung 15).

### 5.6.3 Gebundenes 2-MCPD

Die Ergebnisse für gebundenes 2-MCPD in Säuglingsmilchnahrung zeigten eine mittlere Belastung von 0,185 mg/kg Fett (Median 0,196 mg/kg Fett,  $n = 70$ ), die damit in etwa halb so hoch war wie die von gebundenem 3-MCPD. Die Einzelwerte für beide Verbindungen zeigten eine hohe Korrelation (Abbildung 16c). Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen zur Belastung von Säuglingsmilchnahrung mit gebundenem 2-MCPD liegen bisher nicht vor. Für andere Matrices liegen nur Daten von Kuhlmann (2011a) vor, der für Soja-Bohnen-, Raps-, Sonnenblumen- und Palmöl vergleichbare Verhältnisse zwischen 0,4 und 0,6 publizierte. Möglicherweise erfolgt die Bildung von 2- und 3-MCPD-Estern bei der Raffination in einem eng begrenzten Verhältnis zueinander.

Für gebundenes 2-MCPD errechnet sich für nicht-gestillte Säuglinge auf gleicher Basis wie bei gebundenem 3-MCPD eine durchschnittliche tägliche Aufnahme von 1,11 µg/kg KG (mittlerer Gehalt 0,185 mg/kg Fett,  $n = 70$ ). Eine Bewertung dieser Exposition ist nicht möglich, da bisher keine geeigneten Studien vorliegen, die eine Risikobewertung mit Ableitung eines TDI-Wertes erlauben würden (Andres *et al.* 2013).

#### 5.6.4 Gebundenes Glycidol

Die Ergebnisse für gebundenes Glycidol in Säuglingsmilchnahrung zeigten eine mittlere Belastung von 0,356 mg/kg Fett (Median 0,253 mg/kg Fett, n = 70). Auffällig waren die Werte bei den Marken E und F (Eigenmarken zweier Discounter), die bis auf eine Ausnahme deutlich über den Werten der anderen Hersteller lagen. Das in dieser Eindeutigkeit überraschende Ergebnis lässt vermuten, dass bei der Herstellung auf billigere Fette zurückgegriffen wird. Auf Veranstaltungen zum Thema MCPD- und Glycidyl-Fettsäureester wurde unter der Hand von Vertretern der Industrie geäußert, dass weniger belastete Fette auf dem Markt zu höheren Preisen angeboten werden. Hier würden sich nicht nur höhere Kosten bei der Herstellung niederschlagen (beispielsweise Rohstoffauswahl), sondern sich auch die Marktverhältnisse widerspiegeln (begrenztes Angebot trifft auf erhöhten Bedarf). Zitierbare Referenzen für diese Aussagen liegen nicht vor. Bei gebundenem 2- und 3-MCPD zeigte sich bei den Marken E und F kein entsprechendes Phänomen.

Untersuchungen anderer Gruppen zum Gehalt von GE in Säuglingsmilchnahrung liegen nicht vor bis auf die oben (vgl. 2.2) genannte Untersuchung des CVUA Stuttgart, in der für die Zeitpunkte April 2009, Oktober 2009 und Mai 2010 Median-Gehalte an gebundenem Glycidol von 0,95, 0,30 bzw. < 0,15 mg/kg Fett ermittelt wurden (maximal 5,33, 3,01 bzw. 2,58 mg/kg Fett, n=40 insgesamt, Weißhaar 2011). Diese Ergebnisse legten schnelle Erfolge bei der Reduktion der Gehalte nahe, beispielsweise durch einfache technologische Änderungen der Raffinationsbedingungen. Bei Betrachtung der Ergebnisse dieser Untersuchung (n=70, Probenahme Anfang 2013) ist allerdings festzustellen, dass der Medianwert von 0,253 mg/kg Fett deutlich über dem der letzten Untersuchung des CVUA Stuttgart im Mai 2010 liegt. Über die Gründe hierfür kann nur spekuliert werden. Möglicherweise hat die geringe Probenzahl zu einem zufällig besonders niedrigen Ergebnis beigetragen, möglicherweise ist das Ergebnis auch durch die damals verwendete Differenzmethode bedingt, die weniger verlässliche Ergebnisse liefert (vgl. 2.4.1). Details der von der Industrie durchgeführten Maßnahmen (wie Veränderungen der Raffinationsbedingungen, Austausch der Fettquelle) werden mit Hinweis auf das Herstellergeheimnis bisher nicht veröffentlicht.

Für die Expositionsschätzung von nicht-gestillten Säuglingen gegenüber gebundenem Glycidol bedeuten die aktuellen Ergebnisse, dass sich für den mittleren Gehalt von 0,356 mg/kg Fett eine durchschnittliche Belastung von 2,14 µg/kg KG errechnet (Rechenbasis des BfR: Trockenpulver 15 g/100 ml trinkfertige Milch, 25 % Fettanteil im Milchpulver, Verzehr 160 ml/kg KG, vollständige Hydrolyse bei der Verdauung); der entsprechende „Margin of Exposure“ (MoE) beträgt 1900 (Referenzwert für die kanzerogene Wirkung: 4,06 mg/kg KG, BfR 2009) und liegt damit deutlich unterhalb des mindestens anzustrebenden Wertes von

---

10000 (vgl. 2.3). Daher müssten die Gehalte noch mindestens um den Faktor 5,3 abgesenkt werden (d.h. mittlerer Gehalt an gebundenem Glycidol höchstens 0,067 mg/kg Fett), damit das Risiko nur noch als „low concern“ bewertet wird.

Die hier gemachten Rechnungen für den mittleren Gehalt sind mit Blick auf die durchschnittliche Exposition von nicht-gestillten Kindern in Deutschland jedoch nur als Schätzung zu betrachten, da Mittelwerte der Untersuchungen von 7 Marken zugrunde liegen. Eigentlich wäre für diese Berechnung als Gewichtungsfaktor die Kenntnis der Marktanteile der verschiedenen Marken in Deutschland erforderlich; diese Zahlen sind jedoch nicht bekannt. Zudem ist zu bedenken, dass gerade bei Babynahrung von einer hohen Markentreue auszugehen ist. Für die Konsumenten der Marken E und F bedeutet dies aktuell eine mittlere tägliche Exposition von 3,23 µg/kg KG (mittlerer Gehalt 0,538 mg/kg Fett, MoE 1260) bzw. von 5,04 µg/kg KG (mittlerer Gehalt 0,840 mg/kg Fett, MoE 806). Gerade bei diesen beiden Marken ist wegen des niedrigen Preises von einer hohen Markentreue auszugehen. Speziell für Säuglinge erscheint es nicht akzeptabel, dass in einem reichen Industrieland der Preis der Nahrung die Expositionshöhe für eine kanzerogene Substanz bestimmt.

## Schlussfolgerungen

Bei den Untersuchungen wurden zunächst verschiedene Ansätze getestet mit der Frage, mit welchen Methoden gebundenes Glycidol in Lebensmitteln zuverlässig quantifiziert werden kann. Für die Ermittlung der Belastung von Lebensmitteln sind Methoden mit Säure-katalysierter Esterhydrolyse besser geeignet, simultan die Belastung mit gebundenem 3-MCPD, 2-MCPD und Glycidol zu untersuchen, als Methoden bei denen die Esterhydrolyse alkalisch katalysiert durchgeführt wird. Eine wesentliche Ursache dafür ist die bidirektionale Umwandlung der Analyten unter alkalischen Bedingungen. Die von Ermacora und Hrncirik (2012) entwickelte Methode ist nicht nur für die Untersuchung von Speiseölen, sondern auch für die Ermittlung der Belastung von Säuglingsmilchnahrung geeignet und liefert bis in den Bereich von circa 0,15 mg/kg Fett zuverlässige Ergebnisse für gebundenes 3-MCPD, 2-MCPD und Glycidol. Die Extraktion des Fettes mittels automatisierter beschleunigter Löse-mittelextraktion stellt dabei ein adäquates Extraktionsverfahren dar. In Bezug auf die Quanti-fizierung von gebundenem Glycidol ist festzustellen, dass die Empfindlichkeit der verwen-de-ten Analysenmethode bei der gegenwärtigen Belastung von Säuglingsmilchnahrung ausreichend ist; um zukünftig auch Werte zuverlässig im Bereich des anzustrebenden Berei-ches von maximal 0,067 mg/kg Fett zu erreichen, ist eine weitere Verbesserung der Empfind-lichkeit erforderlich.

Die direkte Bestimmung von gebundenem Glycidol hat bei der Messung von Säuglings-milchnahrung keinen Vorteil gegenüber einer indirekten Methode. Bei der Messung von nied-rig belasteten Proben hat sich die verwendete LC-APCI-MS-Methode als zu unempfindlich herausgestellt. Einzelne GE können im relevanten Konzentrationsbereich nicht zuverlässig bestimmt werden, da sie entweder unter der jeweiligen Nachweisgrenze der Methode liegen oder keine Standardsubstanzen vorhanden sind. Der erhoffte Zugewinn an Spezifität durch die Messung substanzspezifischer Übergänge mittels GC-MS/MS oder LC-MS/MS liefert durch das Fehlen charakteristischer Hauptfragmente keine Verbesserung.

In Bezug auf die aktuelle Exposition von nicht-gestillten Säuglingen ist festzustellen, dass es den Herstellern von Säuglingsmilchnahrung offenbar in den zurückliegenden Jahren durch geeignete Maßnahmen gelungen ist, die Gehalte an gebundenem 3-MCPD deutlich abzu-senken. Derzeit liegt die aktuelle Exposition nicht-gestillter Säuglinge nur noch gering über

dem TDI-Wert. Die Glycidol-Gehalte der aktuell untersuchten Säuglingsmilchnahrungen wurden im Vergleich des initial abgeschätzten Gehaltes zwar circa um den Faktor 3 reduziert. Dennoch errechnet sich aus der durchschnittlichen Belastung ein zu geringer Margin of Exposure. Deshalb sollten weitere Maßnahmen ergriffen werden, insbesondere den Gehalt an gebundenem Glycidol in Säuglingsmilchnahrung zu reduzieren. Da in den beiden preisgünstigsten Handelsmarken konstant höhere Gehalte an gebundenem Glycidol nachgewiesen wurden, ist zu vermuten, dass die Hersteller billigeres Fett mit höheren Gehalten verwenden. Gebundenes 2-MCPD wurde in jeder Probe Säuglingsmilchnahrung nachgewiesen. Deshalb sollten künftige Studien zur Toxikologie dieser Verbindungen durchgeführt werden.

Mit der entwickelten empfindlichen Analysenmethode konnte weder in Humanmilch noch in Ziegenmilch gebundenes 3-MCPD nachgewiesen werden. In Deutschland sind gestillte Kinder in den ersten Lebensmonaten daher gegenwärtig mindestens um den Faktor 10 niedriger exponiert als nicht-gestillte Kinder. Die Ursache der Diskrepanz zu den Humanmilch-Befunden von Zelinková *et al.* (2008) konnte nicht geklärt werden, ein starker Rückgang der Exposition Erwachsener ist unwahrscheinlich. Die grundsätzliche Frage, ob bei Exposition gegenüber (freiem oder gebundenem) 3-MCPD ein Teil der Dosis im Säugtierorganismus zu 3-MCPD-Fettsäureestern (re)synthetisiert werden kann, erscheint weiterhin offen und kann nur durch tierexperimentelle Untersuchungen abgeklärt werden.



## Zusammenfassung

Erst seit wenigen Jahren ist das Vorkommen der Fettsäureester von 3-Monochlorpropandiol (3-MCPD) und Glycidol im einstelligen mg/kg-Bereich in pflanzlichen Speisefetten bekannt. Diese Prozesskontaminanten entstehen während der Fettraffination. Nicht-gestillte Säuglinge sind gegenüber 3-MCPD und Glycidol in den ersten Lebensmonaten besonders stark exponiert, da raffinierte Speisefette die Fettbasis für industriell hergestellte Säuglingsmilchnahrung bilden und Kinder in diesem Alter einen besonders hohen körpergewichtsbezogenen Fettbedarf haben. Die abgeschätzte Exposition gegenüber den beiden Kontaminanten lag initial deutlich höher als die Menge, die toxikologisch als unbedenklich anzusehen ist. Mittlerweile wurden auch 2-MCPD-Fettsäureester in raffinierten Speisefetten nachgewiesen. Die Industrie arbeitet seit Bekanntwerden der Problematik an Maßnahmen zur Reduktion.

Als nicht unerhebliches Problem hat sich die Analytik von estergebundenem MCPD und Glycidol herausgestellt. In diesem Zusammenhang sind insbesondere zu nennen: die große Anzahl an Analyten beim direkten Nachweis der intakten Ester, die mögliche bidirektionale Umwandlung von Glycidol und MCPD während der erforderlichen Esterhydrolyse beim indirekten Nachweis, die Auswahl geeigneter Referenzsubstanzen, sowie die strukturelle Ähnlichkeit zu den gleichzeitig in den Fetten vorkommenden Mono- und Diglyceriden.

Obwohl seit Jahren an der komplexen Problematik gearbeitet wird, wurden bislang vorwiegend Methoden für die Analyse von Speisefetten und -ölen, nicht aber für komplexe Matrices wie Milch und Milchpulver veröffentlicht.

Aufgabe dieser Promotionsarbeit war zunächst, verschiedene Analysenverfahren zu testen mit dem Ziel der Entwicklung einer validen Methode zum Nachweis von estergebundenem 3-MCPD, 2-MCPD und Glycidol in Säuglingsmilchnahrung. Mit einer indirekten Analysenmethode wurden schließlich 70 Proben Säuglingsmilchnahrung auf dem deutschen Markt (7 verschiedene Hersteller, jeweils 5 unterschiedliche Chargen von Pre- und 1-Nahrungen) analysiert.

Zudem wurde eine sensitive Analysenmethode für den Nachweis von estergebundenem MCPD in flüssiger Milch entwickelt, da 2008 von einer tschechischen Forschergruppe überraschenderweise in 12 von 14 Humanmilchproben estergebundenes 3-MCPD nachgewiesen wurde; somit schien sich das Problem der 3-MCPD-Kontamination von Säuglingsmilchnahrung zu relativieren. Bereits in den 1980er Jahren hatten US-amerikanische Forscher über den qualitativen Nachweis von 3-MCPD-Fettsäureestern in Ziegenmilch berichtet.

In allen 70 untersuchten Säuglingsmilchnahrungen konnte estergebundenes 3-MCPD, 2-MCPD und Glycidol nachgewiesen werden. Für die mittlere Belastung mit estergebundenem

3-MCPD von 0,416 mg/kg Fett errechnet sich für nicht-gestillte Säuglinge in den ersten Lebensmonaten eine mittlere tägliche Aufnahme von 2,5 µg/kg KG. Diese Exposition liegt nur noch gering über dem TDI-Wert von 2 µg/kg KG. Offenbar ist es den Herstellern in den letzten Jahren gelungen, die Gehalte durchschnittlich circa um den Faktor 5 abzusenken. Bei Vergleich der einzelnen Handelsmarken fanden sich keine besonders auffälligen Unterschiede.

Anders sieht dies für ester gebundenes Glycidol aus. Hier zeigte sich eine mittlere Belastung (0,356 mg/kg Fett), die etwa um den Faktor 3 unter den initialen Abschätzungen liegt. Daraus errechnet sich eine durchschnittliche Belastung von 2,14 µg/kg KG; der entsprechende „Margin of Exposure“ (MoE) für dieses genotoxische Kanzerogen beträgt 1900 und liegt damit deutlich unterhalb des mindestens anzustrebenden Wertes von 10000. Beim Vergleich der 7 Handelsmarken fielen 2 Eigenmarken von Discounter auf, die mit durchschnittlichen Gehalten von 0,538 mg/kg Fett (MoE 1260) bzw. von 0,840 mg/kg Fett (MoE 806) deutlich höher belastet waren. Möglicherweise wird hier regelmäßig billigeres Fett mit höheren Gehalten an ester gebundenem Glycidol verwendet.

In Humanmilchproben von 24 Frauen sowie in Milchproben von 7 Ziegen konnte weder gebundenes 2-MCPD noch gebundenes 3-MCPD nachgewiesen werden. Die Exposition gestillter Kinder gegenüber ester gebundenem 3-MCPD beträgt weniger als 0,38 µg/kg KG und liegt somit deutlich unterhalb des TDI-Wertes. Die Ursache der Diskrepanz zu den Untersuchungsergebnissen der tschechischen Arbeitsgruppe aus dem Jahr 2008 ist unbekannt, verschiedene Möglichkeiten werden diskutiert.

Mit diesen Untersuchungen ist es erstmals gelungen, die aktuelle Exposition von gestillten und nicht-gestillten Säuglingen in Deutschland gegenüber den drei Kontaminanten aussagekräftig zu beschreiben. Insbesondere bei ester gebundenem Glycidol in Säuglingsmilchnahrung sind weitere Anstrengungen der Industrie erforderlich, um die Gehalte deutlich abzusenken.

## Abstract

Since a few years only, the occurrence of fatty acid esters of 3-monochloropropandiol (3-MCPD) und glycidol in the single-digit mg/kg range in edible plant fats is known. These process contaminants are formed during refining. Formula-fed infants are especially exposed to 3-MCPD and glycidol during their first months of age because refined plant fats build the fat basis of industrially produced formula, and because children of this age have a high body-weight-based fat requirement. The exposure to the two contaminants was initially estimated to be distinctly higher than the daily amount considered to be safe. Meanwhile, fatty acid esters of 2-monochloropropandiol have also been detected in refined fats. Since the problems became known, food industry is working on measures of reduction.

Determination of ester-bound 3-MCPD and glycidol has become apparent to be no negligible problem. The following points have to be mentioned in this context: the high number of analytes in case of direct detection of the intact esters, the possible bidirectional conversion of MCPD and glycidol during the necessary hydrolysis of the esters in case of indirect detection, the selection of suitable reference compounds, as well as the structural resemblance of mono- and diglycerides also occurring in these fats.

Despite many years of work on the sophisticated problems, so far analytical methods have been published primarily for edible fats and oils, but not for complex matrices like milk and milk powder.

First task of this doctoral research studies was to test different analytical procedures with the aim to develop a valid method for the determination of ester-bound 3-MCPD, 2-MCPD and glycidol in infant formula. Finally, an indirect method was used to analyse 70 samples of infant formula from the German market (5 different badges of “pre” and “1” formula each from 7 brands).

Furthermore, a sensitive analytical method was developed for the detection of ester-bound MCPD in liquid milk, as a Czech research group has published the surprising occurrence of ester-bound 3-MCPD in 12 of 14 samples of human milk in 2008; therefore, the problem of contamination of infant formula with 3-MCPD seemed to be only a relative one. In the 1980s, American researchers already reported on the qualitative detection of 3-MCDP fatty acid esters in goat milk.

Ester-bound 3-MCPD, 2-MCPD and glycidol could be detected in all 70 samples of infant formula. For the mean level of ester-bound 3-MCPD of 0.416 mg/kg fat, the mean daily exposure of formula-fed infants in the first months of age was calculated to be 2.5 µg/kg body weight which is only slightly above the TDI of 2 µg/kg body weight. Obviously, the producers

were able to reduce the mean levels by a factor of roughly 5 during the last years. Comparing the brands investigated, no remarkable differences were observed.

This is different for glycidol. The mean level (0.356 mg/kg fat) was found to be lower than the initial estimates by a factor of roughly 3. The mean daily exposure was calculated to be 2.14 µg/kg body weight; this corresponds to a "Margin of Exposure" (MoE) of 1900 for this genotoxic carcinogen which is far below the value of 10000 to be reached at least. Comparing the 7 brands investigated, two brands of discounters had strikingly higher mean levels of 0.538 mg/kg fat (MoE 1260) and 0.840 mg/kg fat (MoE 806), respectively. In case of these brands, possibly cheaper fats with higher contents of ester-bound glycidol are used regularly.

In samples of human milk from 24 women and of milk from 7 goats, no ester-bound 2-MCPD or 3-MCPD could be detected. Daily exposure of breast-fed infants to bound 3-MCPD was calculated to be lower than 0.38 µg/kg body weight which is far lower than the TDI. The cause for the discrepancy from the results of the Czech research group published 2008 is unknown, different possible reasons are discussed.

For the first time, these results allow a meaningful description of the current exposure of breast-fed und formula-fed infants to the three contaminants in Germany. Especially for ester-bound glycidol in infant formula, further efforts of the industry are necessary to reduce the levels distinctly.

## Literaturverzeichnis

Abraham, K., Appel, K. E., Berger-Preiss, E., Apel, E., Gerling, S., Mielke, H., Creutzenberg, O., Lampen, A. (2013). Relative oral bioavailability of 3-MCPD from 3-MCPD fatty acid esters in rats. *Archives of Toxicology* 87: 649–659.

Agilent. (2009). 7000A Triple Quadrupole GC/MS System. Concepts guide the big picture. 1st ed. Agilent Technologies. Second Edition, October 2011. Agilent Technologies, Inc. Santa Clara, CA 95051, USA. URL: [www.chem.agilent.com/Library/usermanuals/Public/G7000-90031.pdf](http://www.chem.agilent.com/Library/usermanuals/Public/G7000-90031.pdf) [Zugriff: 18. Juni 2013].

Andres, S., Appel, K. E., Lampen, A. (2013). Toxicology, occurrence and risk characterisation of the chloropropanols in food: 2-Monochloro-1,3-propanediol, 1,3-dichloro-2-propanol and 2,3-dichloro-1-propanol. *Food and Chemical Toxicology* 58: 467–478.

AOCS. (2012). Joint AOCS/JOCS Official Method Cd 28-10: Glycidyl fatty acid esters in Edible Oils. Available from: [www.aocs.org/Store](http://www.aocs.org/Store)

Appel, K. E., Abraham, K., Berger-Preiss, E., Hansen, T., Apel, E., Schuchardt, S., Vogt, C., Bakhiya, N., Creutzenberg, O., Lampen, A. (2013). Relative oral bioavailability of glycidol from glycidyl fatty acid esters in rats. *Archives of Toxicology* (in press, published online 07 May 2013). DOI 10.1007/s00204-013-1061-1

Barocelli, E., Corradi, A., Mutti, A., Petronini, P. G. (2011). Comparison between 3-MCPD and its palmitic esters in a 90-day toxicological study. Scientific Report submitted to EFSA. CFP/EFSA/CONTAM/2009/01. URL: [www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/187e.htm](http://www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/187e.htm).

Becalski, A., Feng, S. Y., Lau, B. P.-Y., Zhao, T. (2012). Glycidyl fatty acid esters in food by LC-MS/MS: method development. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 403: 2933–2942.

BfR (2007). Säuglingsanfangs- und Folgenahrung kann gesundheitlich bedenkliche 3-MCPD-Fettsäureester enthalten. Stellungnahme Nr. 047/2007, URL: [www.bfr.bund.de/cm/343/saeuglingsanfangs\\_und\\_folgenahrung\\_kann\\_gesundheitlich\\_bedenkliche\\_3\\_mcpd\\_fettsaeureester\\_enthalten.pdf](http://www.bfr.bund.de/cm/343/saeuglingsanfangs_und_folgenahrung_kann_gesundheitlich_bedenkliche_3_mcpd_fettsaeureester_enthalten.pdf).

BfR (2009). Erste Einschätzung zur Bewertung der in raffinierten pflanzlichen Fetten nachgewiesenen Gehalte von Glycidol-Fettsäureestern. Stellungnahme Nr. 007/2009, URL: [http://www.bfr.bund.de/cm/343/erste\\_einschaetzung\\_von\\_glycidol\\_fettsaeureestern.pdf](http://www.bfr.bund.de/cm/343/erste_einschaetzung_von_glycidol_fettsaeureestern.pdf)

BfR (2012). 3-MCPD-Fettsäureester in Lebensmitteln. Stellungnahme Nr. 006/2013, URL: [www.bfr.bund.de/cm/343/3-mcpd-fettsaeureester-in-lebensmitteln.pdf](http://www.bfr.bund.de/cm/343/3-mcpd-fettsaeureester-in-lebensmitteln.pdf).

Biotage (2013). Analytical sample preparation. Katalog 2013. URL: [http://vsechicago.ru/files/13627\\_2013\\_biotage\\_sample\\_prep\\_catalog.pdf](http://vsechicago.ru/files/13627_2013_biotage_sample_prep_catalog.pdf). [Zugriff: 18. Juni 2013]

Blumhorst, M. R., Collison, M. W., Cantrill, R., Shiro, H., Masukawa, Y., Kawai, S., Yasunaga, K. (2012). Collaborative study for the analysis of glycidyl fatty acid esters in edible oils using LC–MS. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 90: 493–500.

Cerbulis, J., Parks, O. W., Liu, R. H., Piotrowski, E. G., Farrell, H. M. (1984). Occurrence of diesters of 3-chloro-1,2-propanediol in the neutral lipid fraction of goats' milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 32: 474–476.

Cho, W.-S., Han, B. S., Nam, K. T., Park, K., Choi, M., Kim, S. H., Jeong, J.; Jang, D. D. (2008). Carcinogenicity study of 3-monochloropropane-1,2-diol in sprague-dawley rats. Food and Chemical Toxicology 46: 3172–3177.

Craft, B. D., Chiodini, A., Garst, J., Granvogl, M. (2012). Fatty acid esters of monochloropropanediol (MCPD) and glycidol in refined edible oils. Food Additives & Contaminants: Part A, 30: 46–51.

Crews, C., Chiodini, A., Granvogl, M., Hamlet, C., Hrnčirik, K., Kuhlmann, J., Lampen, A., Scholz, G., Weisshaar, R., Wenzl, T., Jasti, P. R., Seefelder, W. (2012). Analytical approaches for MCPD esters and glycidyl esters in food and biological samples: a review and future perspectives. Food Additives & Contaminants Part A, 30: 11–45.

Crews, C., Houghy, P., Brereton, P., Harvey, D., Macarthur, R., Matthews, W. (2002). Survey of 3-monochloropropane-1,2-diol (3-MCPD) in selected food groups, 1999-2000. Food Additives & Contaminants 19: 22–27.

CVUA Stuttgart. (2007). 3-MCPD-Ester in raffinierten Speisefetten und Speiseölen - ein neu erkanntes, weltweites Problem. URL: [www.cvuas.de/pub/beitrag.asp?ID=717&subid=1](http://www.cvuas.de/pub/beitrag.asp?ID=717&subid=1) [Zugriff: 27. März 2013].

Destailats, F., Craft, B. D., Sandoz, L., Nagy, K. (2012). Formation mechanisms of monochloropropanediol (MCPD) fatty acid diesters in refined palm (*Elaeis guineensis*) oil and related fractions. Food Additives & Contaminants Part A, 29: 29–37.

DGF (2010). DGF-Einheitmethode C-VI 18 (10) zur Bestimmung der 3-MCPD- und Glycidylester. Deutsche Einheitmethoden zur Untersuchung von Fetten, Fettprodukten, Tensiden und verwandten Stoffen. Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft e.V. (Hrsg.) Loseblatt-Ausgabe. 2.Auflage. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart 2010.

DiätV (2010). Deutsche Diätverordnung "Diätverordnung in der Fassung der Bekanntmachung vom 28. April 2005 (BGBl. I S. 1161), zuletzt durch Artikel 1 der Verordnung vom 1. Oktober 2010 (BGBl. I S. 1306) geändert

Divinová, V., Svejková, B., Dolezal, M., Velíšek, J. (2004). Determination of free and bound 3-chloropropane-1,2-diol by gas chromatography with mass spectrometric detection using deuterated 3-chloropropane-1,2-diol as internal standard. Czech Journal of Food Science 22: 182–189.

Dubois, M. (2011). Analysis of MCPD- and Glycidyl- Esters in edible oils. Oral presentation: 102nd AOCS Annual Meeting & Expo; 1–4 May 2011; Cincinnati, OH, USA. URL: [www.aocs.org/files/resourcespdf/8\\_mdu\\_aocs.pdf](http://www.aocs.org/files/resourcespdf/8_mdu_aocs.pdf). [Zugriff 18. Juni 2013]

Dubois, M., Tarres, A., Goldmann, T., Empl, A. M., Donaubaue, A., Seefelder, W. (2012). Comparison of indirect and direct quantification of esters of monochloropropanediol in vegetable oil. Journal of Chromatography A, 1236: 189–201.

Dubois, M., Tarres, A., Goldmann, T., Loeffelmann, G., Donaubaue, A., Seefelder, W. (2011). Determination of seven glycidyl esters in edible oils by gel permeation chromatography extraction and liquid chromatography coupled to mass spectrometry detection. Journal of Agricultural and Food Chemistry 59: 12291–12301.

EC (2001). European Commission Regulation No. 466/2001. Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Official Journal of the European Communities, L77/1 16.

EFSA (2005). Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA related to A Harmonised Approach for Risk Assessment of Substances Which are both Genotoxic and Carcinogenic. The EFSA Journal 282: 1–31.

EG (2002). Entscheidung der Kommission vom 12. August 2002 zur Umsetzung der Richtlinie 96/23/EG des Rates betreffend die Durchführung von Analyse- methoden und die Auswertung von Ergebnissen. Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaft, L 221/8, S.8–36.

EG (2008). Richtlinie 2006/141/EG der Kommission vom 22. Dezember 2006 über Säuglingsanfangsnahrung und Folgenahrung und zur Änderung der Richtlinie 1999/21/EG. (1243), S.1–40.

Ermacora, A., Hrncirik, K. (2012). A novel method for simultaneous monitoring of 2-MCPD, 3-MCPD and glycidyl esters in oils and fats. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 90: 1–8.

FEI (2011). Forschungskreis der Ernährungsindustrie: Untersuchungen zur Bildung von 3-Monochlorpropan-1 , 2-diol- Fettsäureestern ( 3-MCPD-FE ) in Pflanzenölen und Entwicklung von Strategien zu deren Minimierung. Report, S.1–4. URL: [www.fei-bonn.de/projekte/projektdatenbank.html/fv\\_16004/](http://www.fei-bonn.de/projekte/projektdatenbank.html/fv_16004/) [Zugriff: 25. Mai 2013].

Franke, K., Strijowski, U., Fleck, G., Pudiel, F. (2009). Influence of chemical refining process and oil type on bound 3-chloro-1,2-propanediol contents in palm oil and rapeseed oil. *LWT - Food Science and Technology* 42: 1751–1754.

Fry, H., Schödel, C., These, A., Preiß-Weigert, A. (2013). Collaborative study for the determination of fatty acid esters in fat containing foods. BfR-Wissenschaft ISBN: 3-938163-94-1 URL: [www.bfr.bund.de/cm/350/collaborative-study-for-the-determination-of-3-mcpd-and-2-mcpd-fatty-acid-esters-in-fat-containing-foods.pdf](http://www.bfr.bund.de/cm/350/collaborative-study-for-the-determination-of-3-mcpd-and-2-mcpd-fatty-acid-esters-in-fat-containing-foods.pdf).

Haines, T. D., Adlaf, K. J., Pierceall, R. M., Lee, I., Venkitasubramanian, P., Collison, M. W. (2011). Direct determination of MCPD fatty acid esters and glycidyl fatty acid esters in vegetable oils by LC-TOFMS. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 88: 1–14.

Hori, K., Koriyama, N., Omori, H., Kuriyama, M., Arishima, T., Tsumura, K. (2012). Simultaneous determination of 3-MCPD fatty acid esters and glycidol fatty acid esters in edible oils using liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry. *LWT - Food Science and Technology* 48: 204–208.

Hrncirik, K., Zelinkova, Z., Ermacora, A. (2011). Critical factors of indirect determination of 3-chloropropane-1,2-diol esters. *European Journal of Lipid Science and Technology* 113: 361–367.

Huber, W. (2001). Modifikation von DIN 32645 zur Bestimmung der Nachweis- und Erfassungsgrenze. *GIT Labor-Fachzeitschrift* 12/2001 S. 1308-1309.

Kaze, N., Sato, H., Yamamoto, H., Watanabe, Y. (2011). Bidirectional conversion between 3-monochloro-1,2-propanediol and glycidol in course of the procedure of DGF standard methods. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 88: 1143–1151.

Ketola, M., Lyytinen, M.-R., Hotokka, M., Pihlaja, K. (1978). Kinetics and mechanisms of dehydrochlorination reactions of simple 1,2-chlorohydrins in aqueous sodium hydroxide solutions. *Acta Chemica Scandinavica*, B 32: 743–748.

Koletzko, B. (2012). Ernährung im Kindes- und Jugendalter. *Monatsschrift Kinderheilkunde*, 160: 1073–1073.

Krist, S., Buchbauer, G., Klausberger, C. (2008). Lexikon der pflanzlichen Fette und Öle. 1. Auflage. Springer-Verlag, Wien.

Kromidas, S. (2011). Validierung in der Analytik; 2. überarbeitete Auflage, Wiley-VCH Verlag, Weinheim.

Kuhlmann, J. **(2011a)**. Determination of bound 2,3-epoxy-1-propanol (glycidol) and bound monochloropropanediol (MCPD) in refined oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113: 335–344.

Kuhlmann, J. **(2011b)**. Indirect determination of bound glycidol & MCPD in refined oils. Oral presentation 102nd AOCS Annual Meeting & Expo 1-4 May 2011 Cincinnati, Ohio. *Emerging Analytical Issues in Process Contaminants*, S.1–18 [Zugriff 18. Juni 2013].

Kuksis, A., Marai, L., Myher, J. J., Cerbulis, J., Farrell Jr., H. M. **(1986)**. Comparative study of the molecular species of chloropropanediol diesters and triacylglycerols in milk fat. *Lipids* 21: 183–190.

LCI. **(2008)**. Wie viele 3-MCPD-Ester gibt es? – Ein Rechenmodell. Lebensmittelchemisches Institut des Bundesverbandes der Deutschen Süßwarenindustrie: URL: [www.lci-koeln.de/deutsch/veroeffentlichungen/lci-focus/wieviele-3-mcpd-ester-gibt-es-ein-rechenmodell](http://www.lci-koeln.de/deutsch/veroeffentlichungen/lci-focus/wieviele-3-mcpd-ester-gibt-es-ein-rechenmodell) [Zugriff: 25. Mai 2013].

Masukawa, Y., Shiro, H., Kondo, N., Kudo, N. **(2011)**. Generalized method to quantify glycidol fatty acid esters in edible oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 88: 15–21.

Matissek, R., Steiner, G., Fischer, M. **(2010)**. *Lebensmittelanalytik*. vollständig überarbeitete Auflage. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

Matthäus, B., Freudenstein, A., Pudel, F., Rudolph, T. **(2011a)**. Strategien zur Minimierung von 3-MCPD- g in Fettsäureestern und verwandten Verbindungen. Oral presentation 21 November 2011 Ovid-Verband Berlin.

URL: [www.ovid-verband.de/fileadmin/downloads/Veranstaltungen/3-MCPD-\\_und\\_Glycidyl-FE\\_Nov\\_2011/Vortrag\\_Dr\\_Matthaeus.pdf](http://www.ovid-verband.de/fileadmin/downloads/Veranstaltungen/3-MCPD-_und_Glycidyl-FE_Nov_2011/Vortrag_Dr_Matthaeus.pdf) [Zugriff: 26. Mai 2013].

Matthäus, B., Pudel, F., Fehling, P., Vosmann, K., Freudenstein, A. **(2011b)**. Strategies for the reduction of 3-MCPD esters and related compounds in vegetable oils. *European Journal of Lipid Science and Technology* 113: 380–386.

Nagy, K., Sandoz, L., Craft, B. D., Destailats, F. **(2011)**. Mass-defect filtering of isotope signatures to reveal the source of chlorinated palm oil contaminants. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 28: 1492–1500.

NTP. **(1990)**. Toxicology and carcinogenesis studies of glycidol (CAS No. 556-52-5) in F344/N rats and B6C3F1 mice (gavage studies). Technical Report Series No 374. NIH Publication No. 90-2829. Research Triangle Park, NC: National Toxicology Program. URL [http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/LT\\_rpts/tr374.pdf](http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/LT_rpts/tr374.pdf). [Zugriff: 14. Juni 2013]

Paul, A. L. D., Mußhoff, F. **(2009)**. Richtlinie der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen. *Toxichem Krimtech* 73: 142–176.

Rehner, G., Daniel, H. **(2002)**. *Biochemie der Ernährung*. 2. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

Sato, H., Kaze, N., Yamamoto, H., Watanabe, Y. **(2013)**. 2-Monochloro-1,3-propanediol (2-MCPD) dynamics in DGF standard methods und quantification of 2-MCPD. *Journal of the American Oil Chemists' Society* (in press, published online 11 May 2013) DOI 10.1007/s11746-013-2264-6

Sharma, A., Jana, A. H., Chavan, R. S. **(2012)**. Functionality of milk powders and milk-based powders for end use applications - a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 11: 518–528.

Shimizu, M., Kudo, N., Shiro, H. **(2010)**. Comparison of indirect and direct quantification of glycidol fatty acid ester in edible oils. *Journal of Oleo Science* 59: 535–539.



Shimizu, M., Kudo, N., Shiro, H., Yasunaga, K., Masukawa, Y., Katsuragi, Y. and Yasumasu, T. (2011). A comparison of the indirect and direct quantification of glycidol ester by kinetic analysis. *European Journal of Lipid Science and Technology* 113: 985–991.

Shiro, H., Kondo, N., Kibune, N. und Masukawa, Y. (2011a). Direct method for quantification of glycidol fatty acid esters in edible oils. *European Journal of Lipid Science and Technology* 113: 356–360.

Shiro, H., Kondo, N., Masukawa, Y. (2011b). Validation of quantitative method for glycidol fatty acid esters (GEs) in edible oils. Oral presentation: 102 nd AOCS Annual Meeting & Expo; 1–4 May 2011; Cincinnati, OH, USA. URL: [www.aocs.org/files/ResourcesPDF/4\\_20110503\\_AOCS\\_GE\\_revalidation\\_for\\_oral\\_masushiro.pdf](http://www.aocs.org/files/ResourcesPDF/4_20110503_AOCS_GE_revalidation_for_oral_masushiro.pdf). [Zugriff 18. Juni 2013]

Svejkovská, B., Novotný, O., Divinová, V., Réblová, Z., Doležal, M., Velíšek, J. (2003). Esters of 3-Chloropropane-1,2-diol in foodstuffs. *Czech Journal of Food Science* 22: 190–196.

Velíšek, J., Davidek, J., Hajšlová, J., Kubelka, V., Janíček, G., Mánková, B. (1978). Chlorohydrins in protein hydrolysates. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* 167: 241–244.

Velíšek, J., Doležal, M., Crews, C., Dvorák, T. (2002). Optical isomers of chloropropanediols: mechanisms of their formation and decomposition in protein hydrolysates. *Czech Journal of Food Science* 20: 161–170.

Wakabayashi, K., Kurata, Y., Harada, T., Tamaki, Y., Nishiyama, N., Kasamatsu, T. (2012). Species differences in toxicokinetic parameters of glycidol after a single dose of glycidol or glycidol linoleate in rats and monkeys. *The Journal of Toxicological Sciences* 37: 691–698.

Weißhaar, R (2008). Determination of total 3-chloropropane-1,2-diol (3-MCPD) in edible oils by cleavage of MCPD esters with sodium methoxide. *European Journal of Lipid Science und Technology* 110: 183–186.

Weißhaar, R (2010). Fettsäureester von 3-MCPD und Glycidol in Säuglingsmilchnahrung - die ersten Erfolge sind sichtbar. Bericht CVUA Stuttgart, URL: [http://www.cvuas.de/pub/beitrag.asp?subid=1&Thema\\_ID=2&ID=1314&Pdf=No](http://www.cvuas.de/pub/beitrag.asp?subid=1&Thema_ID=2&ID=1314&Pdf=No) [Zugriff: 25. Mai 2013].

Weißhaar, R. (2011). Fatty acid esters of 3-MCPD: Overview of occurrence und exposure estimates. *European Journal of Lipid Science and Technology* 113: 304–308.

Weißhaar, R., Perz, R. (2010). Fatty acid esters of glycidol in refined fats and oils. *European Journal of Lipid Science and Technology* 112: 158–165.

WHO. (2002). Safety evaluation of certain food additives and contaminants 3-Chloro-1,2-Propane-Diol. World Health Organisation, Geneva. URL: [www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v48je18.htm](http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v48je18.htm). [Zugriff: 14.06.2013]

Wöhrlin, F., Fry, H. und Preiß-Weigert, A. (2011). Collaborative study for the determination of 3-MCPD-fatty acid esters in edible fats and oils. Second collaborative study – Part I. method validation and proficiency t3est. BfR-Wissenschaft, ISBN 3-938163-61-5. URL: [www.bfr.bund.de/cm/350/collaborative-study-for-the-determination-of-3-mcpd-fatty-acid-esters-in-edible-fats-and-oils.pdf](http://www.bfr.bund.de/cm/350/collaborative-study-for-the-determination-of-3-mcpd-fatty-acid-esters-in-edible-fats-and-oils.pdf).

Zelinková, Z., Doležal, M., Velíšek, J. (2009). Occurrence of 3-chloropropane-1,2-diol fatty acid esters in infant and baby foods. *European Food Research and Technology* 228: 571–578.

Zelinková, Z., Novotný, O., Schůrek, J., Velíšek, J., Hajslová, J., Dolezal, M. **(2008)**. Occurrence of 3-MCPD fatty acid esters in human breast milk. Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment 25: 669–676.

Zelinková, Z., Svejková, B., Velíšek, J., Dolezal, M. **(2006)**. Fatty acid esters of 3-chloropropane-1,2-diol in edible oils. Food additives and contaminants 23: 1290–1298.

## **Lebenslauf**

Die Seite 102 (Lebenslauf) enthält persönliche Daten. Sie ist deshalb nicht Bestandteil der Veröffentlichung

## Publikationsliste

Stand: Juni 2013

### Diplomarbeit:

**Wöhrlin, F.**, (2008): Analyse von Coumarin, Zimtaldehyd, Zimtsäure, Zimtalkohol, Safrol und Eugenol in Zimt und zimthaligen Erzeugnissen unter besonderer Berücksichtigung der Zubereitung, Friedrich-Schiller-Universität Jena.

### Zeitschriften:

**Wöhrlin, F.**, Fry, H., Abraham, K., Preiss-Weigert, A. (2010) Quantification of flavoring constituents in cinnamon: high variation of coumarin in cassia bark from the German retail market and in authentic samples from Indonesia. *J Agric Food Chem.* 58, 10568-10575.

Abraham, K., **Wöhrlin, F.**, Lindtner, O., Heinemeyer, G., Lampen, A. (2010) Toxicology and risk assessment of coumarin: Focus on human data. *Mol. Nutr. Food Res.* 54, 228–239.

Abraham, K., Pfister, M., **Wöhrlin, F.**, Lampen, A. (2011) Relative bioavailability of coumarin from cinnamon and cinnamon-containing foods compared to isolated coumarin: A four-way crossover study in human volunteers. *Mol. Nutr. Food Res.* 55, 644-653.

### BfR-Wissenschaftsbericht:

**Wöhrlin, F.**, Fry, H., Preiss-Weigert, A. (2012) Collaborative Study for the Determination of 3-MCPD-Fatty Acid Esters in Edible Fats and Oils. Second Collaborative Study – Part I. Method Validation and Proficiency Test. BfR-Wissenschaft 04/2012, Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin, ISBN 3-938163-61-5.

### Kongressbeiträge:

**Wöhrlin, F.**, Fry, H., Preiß-Weigert, A. (2007) Determination of Coumarin, Cinnamaldehyde, Cinnamic Acid, Cinnamyl Alcohol and Cinnamyl Acetate in Cinnamon and Cinnamon-Containing Beverages. Poster at the 3rd International Symposium on Recent Advances in Food Analysis, Prag, 7-9. November 2007

**Wöhrlin, F.**, Fry, H., Preiss-Weigert, A. (2011) Challenges in Analysing Glycidyl-Fatty Acid-Esters in Edible Oils and Fats. Poster at the 9th Euro Fed Lipid Congress, Rotterdam, 18-21. September 2011

**Wöhrlin, F.**, Andres, S. (2012) 3-MCPD- und Glycidyl-Fettsäureester in Lebensmitteln. Vortrag im Rahmen der Fortbildung für den Öffentlichen Gesundheitsdienst 2012. Berlin, 21-23. März 2012

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Ich erkläre, dass mir die geltende Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist.

Die vorliegende Arbeit ist von mir selbst angefertigt. Ich habe keine Textabschnitte eines Dritten oder eigene Prüfungsarbeiten ohne Kennzeichnung übernommen. Alle benutzten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen, Methoden und Quellen wurden in der Arbeit angegeben.

Weitere Personen waren bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts nicht beteiligt.

Die Hilfe eines Promotionsberaters wurde nicht in Anspruch genommen. Ich habe keiner Person weder mittelbar noch unmittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten gegeben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die vorliegende Dissertation wurde bisher weder im In- noch Ausland in gleicher oder ähnlicher Form für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht.

Die vorliegende Dissertation bzw. eine in wesentlichen Teilen ähnliche Arbeit oder eine andere Abhandlung wurde bisher nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht.

Ich versichere, dass ich nach bestem Wissen die Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe.

Berlin, den

---

Friederike Wöhrlin

## 6 Anhang

### 6.1 Berechnung zur Fallzahlabeschätzung

Berechnung der Fallzahlabeschätzung zur Beantwortung der Fragestellung, eine Probe sei mit Wahrscheinlichkeit  $p$  über der Bestimmungsgrenze ( $p=0,1$ , Konfidenz: 0,90, Binomialverteilung): Eine Probe zu messen ist ein Bernoulli-Experiment mit Erfolgswahrscheinlichkeit  $p$  und Misserfolgswahrscheinlichkeit  $q=1-p$ . Die Anzahl der Erfolge/Misserfolge bei  $k$  Messungen folgt einer Binomialverteilung; Berechnung: „Mindestens ein Erfolg“ ist das gleiche wie „nicht nur Misserfolge“, und „ $k$  Misserfolge“ hat die Wahrscheinlichkeit  $q^k$ . Also ist die gesuchte Wahrscheinlichkeit  $1-q^k$ .

Tabelle 16 Berechnung der Mindestanzahl an Proben zur Untersuchung der Belastung von Humanmilch

<b>k</b>	<b>q=1-p</b>	<b>q<sup>k</sup></b>	<b>1-q<sup>k</sup></b>	<b>genug?</b>
1	0,9	0,9000	0,1000	zu wenig
2	0,9	0,8100	0,1900	zu wenig
3	0,9	0,7290	0,2710	zu wenig
...	...	...	...	...
19	0,9	0,1351	0,8649	zu wenig
20	0,9	0,1216	0,8784	zu wenig
21	0,9	0,1094	0,8906	zu wenig
<b>22</b>	<b>0,9</b>	<b>0,0985</b>	<b>0,9015</b>	<b>genug</b>
<b>23</b>	<b>0,9</b>	<b>0,0886</b>	<b>0,9114</b>	<b>genug</b>

## 6.2 Untersuchte Humanmilchproben

Tabelle 17 Daten der untersuchten Humanmilchproben und Ergebnisse der Fettgehaltsbestimmung. Wurden mehrere Milchproben einer Mutter zu unterschiedlichen Zeitpunkten genommen, unterscheiden sich die Probennummern durch Buchstaben hinter der Zahl.

Probennummer	Geburtsjahr der Mutter	Geburtsdatum des Kindes	Alter der Mutter zum Zeitpunkt der Milchnahme (in Jahren)	Zeitpunkt der Milchabgabe nach Geburt in Tagen (Monaten)	Fettgehalt
1	1978	06.10.2012	33	4 (0,13)	2,60%
2	1977	23.10.2012	35	6 (0,2)	1,65%
3	1980	04.10.2012	32	14 (0,46)	1,38%
4a	n.a.	19.11.2003		15 (0,49)	3,10%
4b				83 (2,73)	3,33%
5a	1980	01.12.2011	31	20 (0,66)	4,02%
5b				31 (1,02)	2,69%
6a	1975	04.12.2010	35	23 (0,76)	3,75%
6b				34 (1,12)	3,78%
6c				65 (2,14)	3,40%
7a	1982	03.01.2012	29	9 (0,30)	1,17%
7b				14 (0,46)	1,34%
7c				26 (0,85)	4,67%
8	1981	10.10.2012	31	32(1,05)	1,98%
9	1976	18.12.2011	35	40 (1,31)	2,67%
10	1977	17.09.2012	35	63 (2,07)	1,65%
11a	1978	20.08.2010	32	49 (1,61)	2,40%
11b				69 (2,27)	2,50%
11c				70 (2,30)	1,86%
11d				71 (2,33)	1,40%
12a	1976	08.04.2011	35	91 (2,99)	1,85%
12b				220 (7,23)	0,99%
13a	1978	16.12.2010	33	119 (3,91)	2,89%
13b				200 (6,57)	2,39%
14a	1975	17.01.2011	36	121 (3,98)	3,69%
14b				152 (4,99)	1,99%
15	1976	10.05.2012	36	138 (4,53)	2,86%
16a	1968	17.03.2008	39	138 (4,53)	1,22%
16b				169 (5,55)	2,90%
17a	1980	09.01.2012	32	153 (5,03)	1,16%
17b				192 (6,31)	1,85%

Fortsetzung Tabelle 17

Proben- nummer	Geburtsjahr der Mutter	Geburtsdatum des Kindes	Alter der Mutter zum Zeitpunkt der Milchnahme (in Jahren)	Zeitpunkt der Milchabgabe nach Geburt in Tagen (Mo- naten)	Fettgehalt
18	1979	16.06.2012	33	159 (5,22)	4,10%
19	1980	10.05.2012	31	163 (5,35)	2,11%
20	1976	07.07.2012	36	165 (5,42)	1,55%
21	1972	20.05.2012	40	178 (5,85)	3,77%
22	1977	22.12.2011	35	190 (6,24)	5,45%
23	1976	01.05.2012	36	201 (6,60)	2,68%
24a	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	5,06%
24b			n.a.		2,12%
24c			n.a.		2,93%
24d			n.a.		4,09%
24e			n.a.		2,05%



## 6.3 Ernährungsfragebogen

Ernährungs-Fragebogen zur Untersuchung der Belastung von Humanmilch mit 2- und 3-MCPD-Fettsäureestern

Vielen Dank, dass Sie Muttermilch für dieses Projekt zur Verfügung stellen! Um die Untersuchungsergebnisse besser interpretieren zu können, wäre es schön, wenn Sie die folgenden Fragen zu Ihrem Essverhalten beantworten können. Wenn es schon eine Weile her ist, dass Sie die Probe abgegeben haben, erinnern Sie sich bitte an die Zeit vor/während der betreffenden Schwangerschaft.

Selbstverständlich werden Ihre Angaben und Untersuchungsergebnisse anonym gehalten.

Name der Mutter \_\_\_\_\_ Geburtsdatum \_\_\_\_\_ Geburtsdatum Kind \_\_\_\_\_  
Datum Probenahme \_\_\_\_\_

Haben Sie vor dieser Stillperiode schon ein weiteres Kind gestillt?

☐ Ja, \_\_\_\_\_ Kind(er) ☐ nein

Wie ernährten Sie sich in den letzten 10 Jahren vor dieser Schwangerschaft?

		Jahr	bis	Jahr
<input type="checkbox"/> Gemischte Kost	von	_____	bis	_____
<input type="checkbox"/> vegetarisch	von	_____	bis	_____
<input type="checkbox"/> vegan	von	_____	bis	_____
<input type="checkbox"/> Sonstiges	von	_____	bis	_____

Wie oft essen/aßen Sie folgende Lebensmittel während dieser Stillperiode:	(fast) nie	1x pro Monat	2-3x pro Monat	etwa 1x pro Woche	mehrmals pro Woche	(fast) täglich
Butter	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Margarine	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
fetthaltige Süßigkeiten (z.B.: Schokolade, Pralinen, Kekse, Schokoriegel)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Süße Brotaufstriche wie Nuss-Nougat-Creme (z.B.: Nutella, Erdbeercreme)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pflanzliche Brotaufstriche (z.B.: Tartex, vegetarisches Schmalzzubereitung)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Frittierte Lebensmittel (z.B.: Pommes Frites, Wedges, Kroketten)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Gebratene Lebensmittel (z.B.: Bratkartoffeln, Kartoffelpuffer, Fleisch)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Fettgebackene Süßigkeiten (z.B.: Krapfen, Berliner Pfannkuchen)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Herzhafte Snacks (z.B.: Kartoffelchips, Flips)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Wie oft essen Sie außer Haus?	(fast) nie	1x pro Monat	2-3x pro Monat	etwa 1x pro Woche	mehrmals pro Woche	(fast) täglich
Im Restaurant	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
In der Betriebskantine	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
An einer Imbissbude	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

## Ernährungs-Fragebogen zur Untersuchung der Belastung von Humanmilch mit 2- und 3-MCPD-Fettsäureestern

<b>Zuhause kochen</b>	<b>(fast) nie</b>	<b>1x pro Monat</b>	<b>2-3x pro Monat</b>	<b>etwa 1x pro Woche</b>	<b>mehrmals pro Woche</b>	<b>(fast) täglich</b>
Wie oft bereiten Sie zuhause eine warme Mahlzeit zu?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Welche der folgenden Speiseöle verwenden Sie im Haushalt?						
Rapsöl	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Olivenöl	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Walnussöl	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Traubenkernöl	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Sonnenblumenöl	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Distelöl	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Frittier- und Bratfette (z.B. Palmin/Biskin)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Bemerkungen:

Vielen Dank!

## 6.4 Auswertung des Ernährungsfragebogens

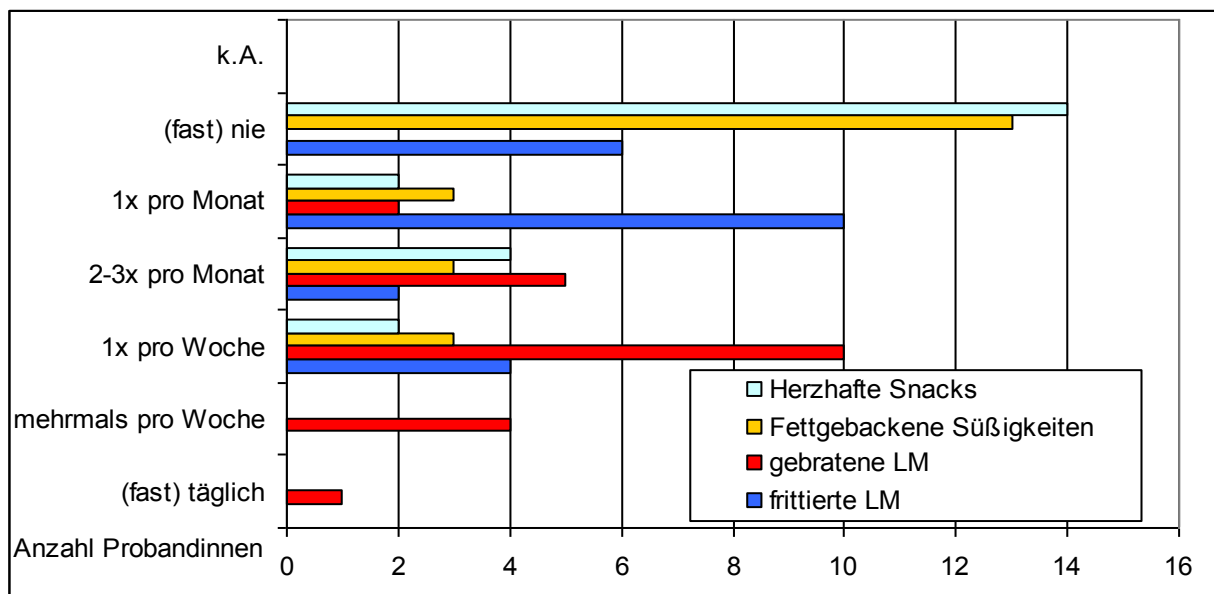


Abbildung 20 Angaben zur Häufigkeit des Verzehrs von Lebensmitteln, in denen 3-MCPD-Ester nachgewiesen wurden

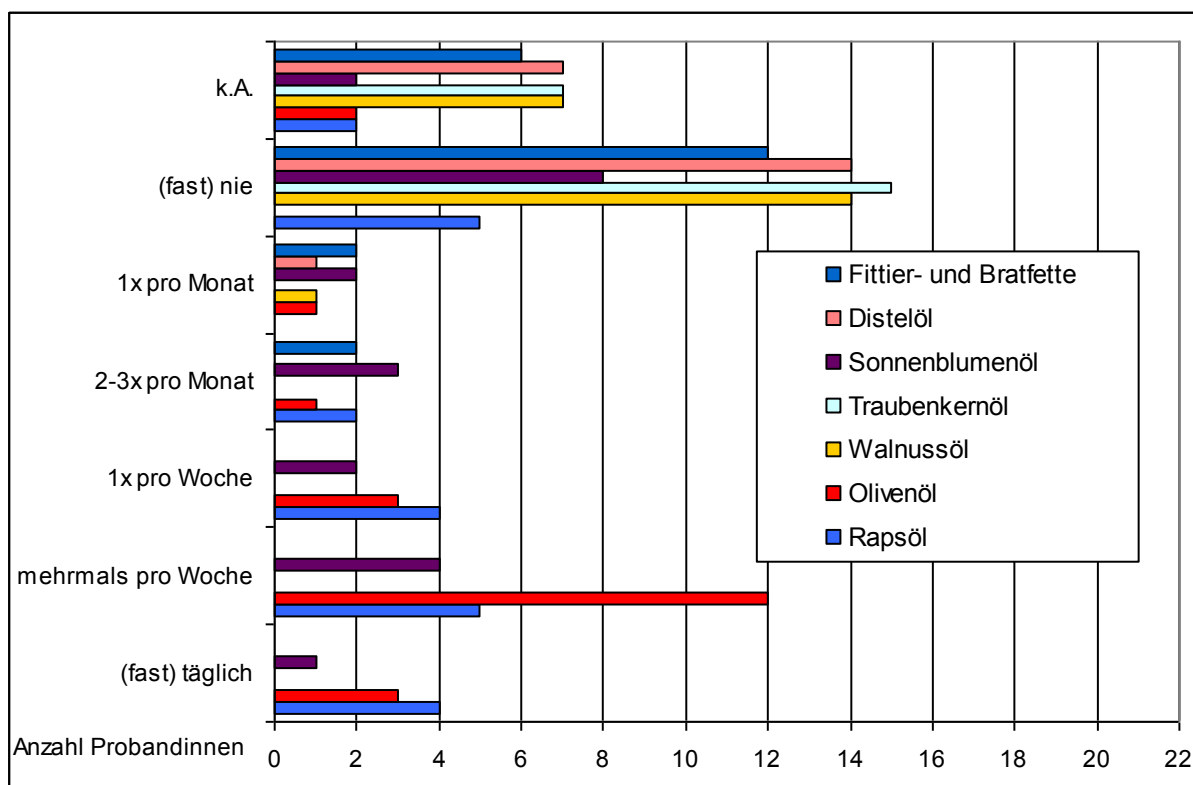


Abbildung 21 Angaben zur Häufigkeit der Verwendung verschiedener Speiseöle im Haushalt

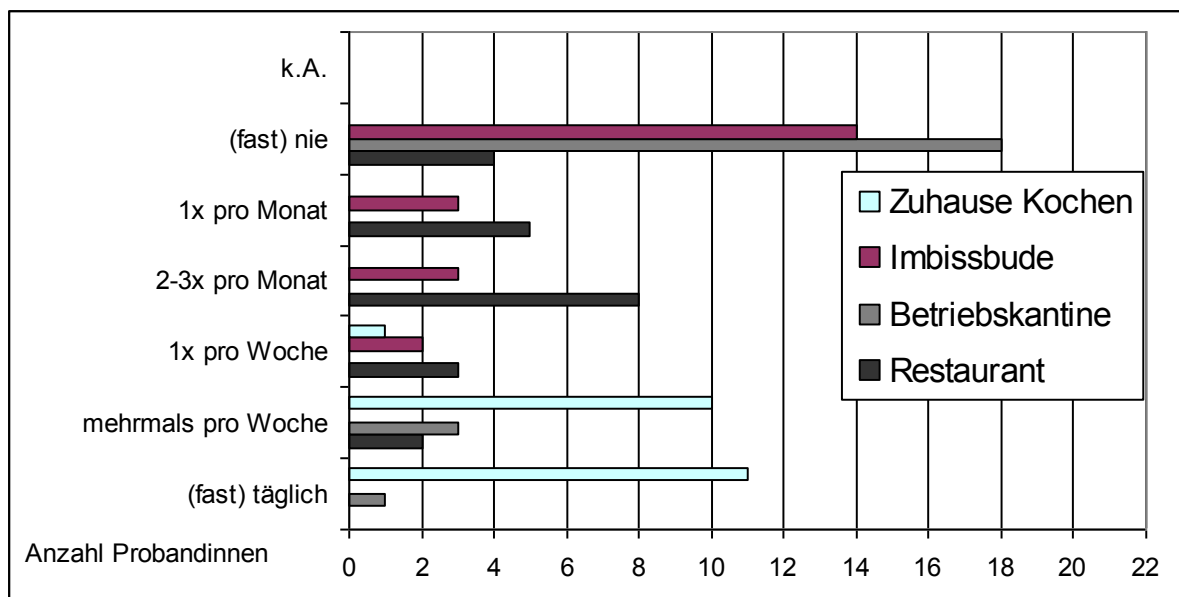


Abbildung 22 Angaben, wie oft außer Haus gegessen bzw. zuhause gekocht wurde.

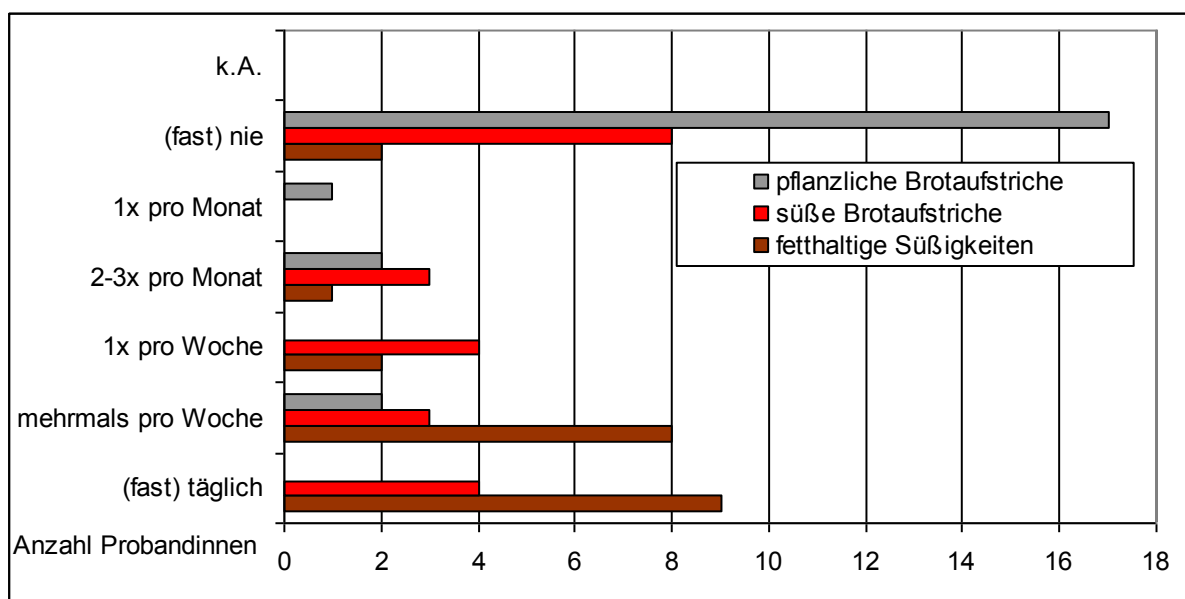


Abbildung 23 Angaben zur Häufigkeit des Verzehrs von Brotaufstrichen und Süßigkeiten, in denen 3-MCPD-Ester nachgewiesen wurden

## 6.5 Einzeldaten der untersuchten Ziegenmilchproben

Tabelle 18 Daten der untersuchten Ziegenmilchproben und Ergebnisse der Fettgehaltsbestimmung. Von jeder Ziege wurden jeweils zwei Proben (a und b) zu unterschiedlichen Zeitpunkten genommen und analysiert.

Proben-nummer	Geburtsdatum Mutterziege	Anzahl Laktationen (bei unbekanntem Geburtsdatum seit Aufnahmedatum im BfR)	Geburtsdatum Lamm	Alter der Mutter zum Zeitpunkt der Milchabgabe in Jahren	Zeitpunkt der Milchabgabe nach Geburt in Tagen (Monaten)	Fettgehalt
6a	unbekannt, Aufnahmedatum 18.09.2006	6. Laktation	10.02.2012	>6	46	3,0%
6b	unbekannt, Aufnahmedatum 18.09.2006	6. Laktation	10.02.2012		52	3,5%
9a	unbekannt, Aufnahmedatum 27.11.2006	5. Laktation	06.02.2012	>6	50	2,7%
9b	unbekannt, Aufnahmedatum 27.11.2006	5. Laktation	06.02.2012		50	2,7%
73a	unbekannt, Aufnahmedatum 17.06.2006	4. Laktation	06.02.2012	>6	50	3,4%
73b	unbekannt, Aufnahmedatum 17.06.2006	4. Laktation	06.02.2012		56	3,2%
419a	17.01.2007	4. Laktation	06.02.2012	5	50	3,7%
419b	17.01.2007	4. Laktation	06.02.2012		56	2,9%
420a	17.01.2007	4. Laktation	05.02.2012	5	57	3,2%
420b	17.01.2007	4. Laktation	05.02.2012		51	3,3%
428a	24.01.2007	4. Laktation	07.02.2012	5	55	2,6%
428b	24.01.2007	4. Laktation	07.02.2012		49	2,9%
429a	17.01.2007	4. Laktation	05.02.2012	5	51	3,0%
429b	17.01.2007	4. Laktation	05.02.2012		57	3,0%

## **6.6 Verzeichnis der verwendeten Geräte, Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und Standardsubstanzen**

### **6.6.1 Allgemeine Laborgeräte**

Accelerated Solvent Extractor ASE 200 mit Lösungsmittelkabinett und Kompressor Modell 6-4, Firma (Dionex)

ASE 22 ml Extraktionszellen mit Schraubverschluss

Analysenwaage AE200/9 (Mettler)

Analysenwaage ME235S (Sartorius)

Eindampfstation: TCS-Probenaufarbeitungssystem vapo therm basis (Labortechnik Barkey)

Gefriertrocknungsanlage Lyovac GT 2 (Steris)

Kolbenhubpipetten, variabel (Eppendorf)

Laborspatel

SPE-Station (Phenomenex)

Tischzentrifuge RT 7 und Rotor RTH 750 (Thermo Scientific)

Trockenschrank (Heraeus)

Ultraschallbad Sonorex RK 255 Transistor (Bandelin)

Transferpettoren, variabel (Brand)

Vortex Genie 2 (Scientific Industries)

Zentrifugengefäße mit Schliffstopfen (12 ml)

### 6.6.2 Verzeichnis der verwendeten Lösungen und Chemikalien

Aceton (Merck 100012), Supra Solv, GC

Ammoniumsulfat (Merck 101217),  $\geq 99\%$ , z.A.

Cyclohexan (Merck 102827), z.A.

Dichlormethan (Merck 1.06054), z.A.

Diethylether (Promochem SO1187), z.A.

Dikaliumoxalat (Merck 105072), extra pure

Essigsäure (Merck 109944) 0.1 mol/l (0.1 N) Titrisol

Ethanol (Merck 100983), z.A.

Ethylacetat (Promochem SO1191), z.A.

Iso-Hexan (Promochem SO1251), z.A.

Iso-Oktan (Merck 15440), Supra solv

Isolute HM-N (I.S.T. 9800)

Methanol (Merck 106035), LC-MS hypergrade

Molekularsieb (Merck 105704), 0,3 nm beads, circa 2 mm

Natriumbromid (VWR 27739.298), 100 %, z.A.

Natriumchlorid (Merck 6404), z.A.

Natriumhydroxid (Merck 6469), z.A.

Natriummethylat (Fluka 71750),  $\geq 97\%$

Natriumsulfat (Merck 1.06649), wasserfrei gekörnt, z.A.

n-Heptan (Merck 104379), z.A.

n-Hexan (Promochem), z.A.

Phenylboronsäure (Fluka 78181),  $> 95\%$

2-Propanol (Merck 101040), HPLC

Schwefelsäure (Merck 112080), 98 %

Tetrahydrofuran (Merck 108107), Secco Solv getrocknet

tertiär-Butylmethylester (Merck 101995), z.A.

Wasser (Reinstwasser)

### 6.6.3 Verbrauchsmaterial

Bechergläser

Graduierte Messkolben verschiedener Größe Klasse A

Reagenzgläser 12 ml Duran mit Schraubverschluss, Rundboden

Pasteurpipetten 150 mm Kalk-Soda-Glas (VWR)

PE-Zentrifugenröhrchen 15 ml Schraubverschluss (Labcon)

ISOLUTE Multimode SPE Columns 300 mg/3 mL C 18 – Diphenyl-Material (Part No.904-0050-B (Biotage))

RP-SPE C18, 500 mg (Waters Sep-Pak Vac RC, WAT036945)

Silica-SPE Siclica 300 mg (Waters Sep-Pak Vac RC, WAT036950)

ASE-Vials 60 ml mit Schraubverschluss und Septum (I-Chem)

Zellulosefilter für ASE-Zellen d=1,983 cm (Dionex)

2 ml Crimp Vials, Klarglas mit Glaseinsatz (0,1 ml)

11 mm Bördelkappen mit Teflon-Silicon-Teflon-Septum bzw. Teflon-Septum (Omnilab)

### 6.6.4 Verzeichnis der verwendeten Standardsubstanzen

Alle Standardsubstanzen wurden über Toronto Research Chemicals, Kanada bezogen.

Glycidyl Laurat (CAS 1984-77-6)

Glycidyl Linolenat (CAS 51554-07-5)

Glycidyl Linolenat-d<sub>5</sub> (CAS : n.n.)

Glycidyl Linoleate (CAS 24305-63-3)

Glycidyl Myristate (CAS 7460-80-2)

Glycidyl Oleate (CAS 5431-33-4)

Glycidyl Oleate-d<sub>5</sub> (CAS: n.n)

Glycidyl Palmitate (CAS 7501-44-2)

Glycidyl Palmitate- d<sub>5</sub> (CAS : n.n)

Glycidyl Stearate (CAS 7460-84-6)

Glycidyl Stearate-d<sub>5</sub> (CAS : n.n)

1,2-Bis-palmitoyl-3-Chloropropanediol (CAS 51930-97-3)

1,2-Bis-palmitoyl-3-Chloropropanediol-d<sub>5</sub> (CAS 1185057-55-9)

1,3-Distearoyl-2-Chloropropanediol (CAS 26787-56-4)

1,3-Distearoyl-2-chloropropanediol-d<sub>5</sub> (CAS: n.n)

Glycidyl Oleate (CAS Number: 5431-33-4)

Glycidyl Oleate-d<sub>5</sub> (CAS : n.n)



### 6.6.5 Messinstrumente

Für die Messung der Milchproben, Säuglingsmilchnahrung und Vorversuche zum direkten Nachweis der Glycidylester wurde das folgende GC-MS-System verwendet:

<b>Gaschromatograph:</b>	Agilent 7890A
<b>Autosampler:</b>	MultiPurpose Sampler MPS 2 LV (Twister) von Gerstel (Mühlheim a.d.R, Deutschland)
<b>Trennsäule:</b>	DB-5ms fused silica column (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, J&W Scientific)
<b>Retention Gap:</b>	Fused Silica deactivated, 5 m x 0,25 mm
<b>Injektor</b>	Split/Splitless-Injektor (Agilent)
<b>Liner:</b>	Insertliner Glasverdampferrohr, einseitig verjüngt mit Glaswolle
<b>Trärgas:</b>	Helium
<b>Massenspektrometer:</b>	Agilent MSD 5975C
<b>Auswertesoftware:</b>	ChemStation Version E.02.00.493 (Agilent Technologies Inc.)

Der direkte Nachweis der Glycidylfettsäureester erfolgte mit folgendem LC-MS/MS-System:

<b>HPLC:</b>	Agilent 1100/1200 mit Degasser, Cap Pump, Säulenofen, Autosampler, Thermostat, Steuermodul
<b>Trennsäule:</b>	Zorbax Eclipse XDB-C 18 (150 mm; ID 4,6; 5 µm) Agilent/993967-902 mit passender Vorsäule
<b>Massenspektrometer:</b>	Applied Biosystems QTrap 4000 Triple Quadrupol Massenspektrometer mit linearer Ionenfalle
<b>Auswertesoftware:</b>	Analyst Version 1.5 (Applied Biosystems)

Der direkte Nachweis der Glycidylfettsäureester erfolge mit folgendem GC-MS/MS-System:

<b>Gaschromatograph :</b>	Agilent 7890A
Autosampler:	MultiPurpose Sampler MPS 2-XL von Gerstel (Mühlheim a.d.R, Deutschland)
Trennsäulen:	DB-5ms fused silica column (2x 15 m x 0,25 mm x 0,25 µm, J&W Scientific)
Injektor	Split/Splitless-Injektor (Agilent)
Liner:	Insertliner Glasverdampferrohr, einseitig verjüngt mit Glaswolle
Trärgas:	Helium
<b>Massenspektrometer:</b>	Agilent 7000B Triple Quad
<b>Auswertesoftware:</b>	MassHunter Analysis Software Version B.05.01

## 6.7 Methodenparameter

### 6.7.1 LC-APCI-MS-Methode für die direkte Messung von Glycidylestern (Methode C)

#### **Probenaufarbeitung** (Joint AOCS/JOCS Official Method Cd 28-10)

Ein Gramm Speisefett oder Öl bzw. extrahiertes Fett wurden in einen 10 ml-Messkolben eingewogen, der Kolben wurde mit t-BME/Ethylacetat 4:1 (v/v) bis zur Marke aufgefüllt und die Probe darin gelöst. Für die Umkehrphasen-SPE wurde eine C18 Sep-Pak Kartusche mit 4x1 ml Methanol konditioniert und 100 µl der Probelösung auf die SPE-Kartusche gegeben. Die Probe wurde mit 3 x 2 ml Methanol eluiert und das Lösungsmittel der vereinigten Extrakte unter Stickstoffzufuhr bei Raumtemperatur bis zur Trockene verdampft. Der Rückstand wurde in 2 ml n-Hexan/Ethylacetat 95:5 (v/v) mit Hilfe eines Vortex für mindestens 30 s vollständig gelöst. Für die Normalphase-SPE wurde eine Sep-Pak Silika-Kartusche mit 4x1 ml n-Hexan/Ethylacetat 95:5 (v/v) konditioniert und die komplette Probelösung auf die SPE-Kartusche gegeben. Die Probe wurde mit 4 x 2 ml n-Hexan/Ethylacetat 95:5 (v/v) eluiert und das Lösungsmittel der vereinigten Extrakte unter Stickstoffzufuhr bei Raumtemperatur bis zur Trockene verdampft. Der Rückstand wurde in 1 ml Methanol/Isopropanol 1:1 (v/v) mit Hilfe eines Vortex für mindestens 30 s vollständig gelöst. Ein Aliquot der Lösung wurde in ein Glasvial für die Messung mit LC-MS überführt. Gegebenenfalls musste die Lösung mit Methanol/Isopropanol 1:1 (v/v) verdünnt werden, damit die Analyten innerhalb des Kalibrierbereichs lagen. Während beider SPE-Prozeduren wurde kein Vakuum angelegt, sondern drucklos eluiert.

#### **HPLC-Parameter**

Die mobile Phase A bestand aus Methanol/Wasser 92:8 (v/v), die mobile Phase B aus 100 % Isopropanol. Der Säulenofen wurde auf 40°C temperiert, das Injektionsvolumen betrug 20 µl. Es wurde ein Gradientenprogramm bei einem Fluss von 1 ml/min verwendet: Von 0-18,0 min 100 % A, von 18,1 bis 25,0 min 20 % A und 80 % B, von 25,1 bis 35,0 min 50 % A und B.

## MS-Parameter

Die Messungen erfolgten im MS-SIM-Modus (Scan Type: Q1 Multiple Ions) APCI positiv. Für jeden Analyten wird ein Quantifizierungsign [M+H]<sup>+</sup> und keine Qualifizierungsignen aufgenommen.

Tabelle 19 Selected Ion Monitoring (SIM) für die protonierten Moleküle [M+H]<sup>+</sup> und zugehörige Einstellungen des Declustering Potential (DP), Retentionszeit (RT) und Dwell time der Methode C.

Analyt	DP	RT in min	m/z $\triangleq$ [M+H] <sup>+</sup>	Dwell time (ms)
Glycidyl-Laurat	76	4,06	257,20	200
Glycidyl-Linolenat-d <sub>5</sub>	91	5,97	340,28	200
Glycidyl-Linolenat	91	6,06	335,20	200
Glycidyl-Myristat	71	6,07	285,20	200
Glycidyl-Linoleat	91	7,78	337,39	200
Glycidyl-Palmitat-d <sub>5</sub>	86	9,35	318,42	200
Glycidyl-Palmitat	86	9,51	313,11	200
Glycidyl-Oleat-d <sub>5</sub>	91	10,41	344,19	200
Glycidyl-Oleat	96	10,60	339,35	200
Glycidyl-Stearat-d <sub>5</sub>	131	15,31	346,23	200
Glycidyl-Stearat	91	15,62	341,26	200

## Berechnung

Kalibrierlösungen: Von jedem Glycidylester wurde eine Stammlösung S0 = 1 mg/ml hergestellt. Hierfür wurden 10 mg jeder Standardsubstanz im 10 ml-Messkolben eingewogen, mit Methanol/Isopropanol 1:1 (v/v) bis zur Marke aufgefüllt und durch Schütteln bzw. im Ultraschallbad gelöst. Ausgehend von einem Standardmix von 10 µg/ml wurden entsprechend Verdünnungen von 1 ng/ml bis 20 ng/ml hergestellt. Für Glycidyl-Stearat wurden Verdünnungen im Bereich von 1,25 ng/ml bis 200 ng/ml hergestellt. Die Kalibrierkurve wurde erstellt, indem die SIM Peakflächen gegen die Standardkonzentrationen aufgetragen wurden. Aus der linearen Funktion  $y = a \cdot x + b$  wurden Steigung und Achsenabschnitt berechnet und mit folgender Formel die Konzentrationen der einzelnen Glycidylester berechnet:

$$c = \frac{S_{\text{Probe}} - b}{10 \cdot a \cdot m}$$

mit

c = Konzentration des Glycidylester in der Probe in mg/kg

S<sub>Probe</sub> = SIM Fläche des Analyten

b = y-Achsenabschnitt der Kalibrierkurve

a = Steigung der Kalibrierkurve, b = y-Achsenabschnitt

m = Probeneinwaage in Gramm

### 6.7.2 Geräteparameter der direkten Bestimmung von Glycidylestern mittels GC-MS/MS

Die Messungen erfolgten mit Elektronenstoßionisation im MRM-Modus unter folgenden Bedingungen:

Injektorprogramm:	Modus pulsed-splitless, 280 °C, Injektionsvolumen 2 µl, Helium 1,0 ml/min
Säulenfluss:	1,2 ml/min (konstant)
GC-Ofenprogramm:	60 °C (1 min halten), anschließend mit 40 °C/min auf 170°C, dann von 10 °C/min auf 260 °C gefolgt von 40°C/min bis 300 °C (1 min halten). Post run: 7 min bei 320°C (backflush).
Kollisionszelle EPC/ Quench gas:	Helium (2,25 ml/min)
Kollisionsgas	Stickstoff (1,5 ml/min)

Einstellungen des Massenspektrometers:

Temperatur Transferline 280°C

Temperatur Ionenquelle 230°C

Temperatur Quadrupol 150°C

Ausgewählte Übergänge, Retentionszeit und optimierte Kollisionsenergien siehe Tabelle 8

### 6.7.3 Geräteparameter für die Bestimmung von MCPD-Estern in Milch mittels GC-MS

Die Messungen erfolgten mit Elektronenstoßionisation (EI) im SIM-Modus unter folgenden Bedingungen:

Injektorprogramm: Modus pulsed-splitless, 180 °C, Injektionsvolumen 2 µl, Helium 3 ml/min

Säulenfluss: 1,2 ml/min (konstant)

GC-Ofenprogramm: 60 °C (1 min halten), anschließend mit 6 °C/min auf 190 °C, gefolgt von 30 °C/min bis 300 °C (10 min halten)

Ausgewählte Fragmentationen der PBA-Derivate für den SIM-Modus

	Ions (m/z)	Dwell (ms)
3-MCPD-Derivat	196	80
	147	80
d <sub>5</sub> -3-MCPD-Derivat	201	80
	150	80
2-MCPD-Derivat	196	80
d <sub>5</sub> -2-MCPD-Derivat	201	80

Einstellungen des Massenspektrometers:

Temperatur Transferline 280°C

Temperatur Ionenquelle 230°C

Temperatur Quadrupol 150°C

#### GC-MS-Auswertung

Als Quantifizierungsionen für 3-MCPD wurden die Fragmentationen m/z 196 bzw. 147 und für den internen Standard d<sub>5</sub>-3-MCPD die Fragmentationen m/z 201 bzw. 150 verwendet. Für das Isomer 2-MCPD wurde das Fragmentation m/z 196 und für den internen Standard d<sub>5</sub>-2-MCPD das Fragmentation m/z 201 verwendet.

Zur Quantifizierung wurden von den Kalibrierstandards die Flächen der Quantifizierungsionen der Phenylboronsäure-Derivate des 3-MCPD bzw. 2-MCPD sowie des internen Standards d<sub>5</sub>-3-MCPD bzw. d<sub>5</sub>-2-MCPD ermittelt und das Verhältnis der Fläche Analyt / Fläche IS gebildet. Zur Erstellung der Kalibrierfunktion wurde das Flächenverhältnis des Standards 3-MCPD bzw. 2-MCPD und des internen Standards d<sub>5</sub>-3-MCPD bzw. d<sub>5</sub>-2-MCPD gegen die Konzentration des 3-MCPD-Standards bzw. 2-MCPD-Standards (µg) aufgetragen. Mit Hilfe einer linearen Regression wurde dann die Kalibrierfunktion ermittelt.

Die Konzentration von 3-MCPD bzw. 2-MCPD im Probenextrakt wurde zunächst als Absolutmenge an freiem 3-MCPD bzw. 2-MCPD in µg im Derivatisierungsansatz angegeben

$$m_{MCPD} = \frac{(R_{Probe} - b)}{a}$$

$m_{MCPD}$  absolute Menge (µg) an 3-MCPD im Derivatisierungsansatz der Probe

$R_{Probe}$  Flächenverhältnis Analyt / interner Standard in der Probe

Unter Berücksichtigung der Einwaage wurde daraus der MCPD-Gehalt in mg/kg berechnet:

$$C = \frac{m_{3MCPD}}{m}$$

C Konzentration 3-MCPD in mg / kg

m Probeneinwaage in g

#### 6.7.4 Bestimmung von gebundenem Glycidol und MCPD in Säuglingsmilchnahrung mittels GC-MS

Die Messung der Säuglingsmilchnahrungsproben erfolgte mit demselben GC-MSD unter denselben Basiseinstellungen wie die Humanmilchproben mit EI im SIM-Modus (Abschnitt 6.7.3).

GC-Ofenprogramm: 60 °C (1 min halten), anschließend mit 6 °C/min auf 180°C, gefolgt von 30 °C/min bis 300 °C (10 min halten)

Ausgewählte Fragmentationen der PBA-Derivate für den SIM-Modus (vgl. auch Abbildung 24)

<b>Gruppe 1 (14,0-17,8 min)</b>	Ions (m/z)	Dwell (ms)
3-MCPD-Derivat	196	80
	198	80
	147	80
d5-3-MCPD-Derivat	201	80
	203	80
	150	80
2-MCPD-Derivat	196	80
d5-2-MCPD-Derivat	201	80

<b>Gruppe 2 (17,8-23,0 min)</b>	Ions (m/z)	Dwell (ms)
3-MBPD-Derivat	240	80
	242	80
	147	80
d5-3-MBPD-Derivat	245	80
	247	80
	150	80
2-MBPD-Derivat	240	80
	242	80
d5-2-MBPD-Derivat	245	80
	247	80

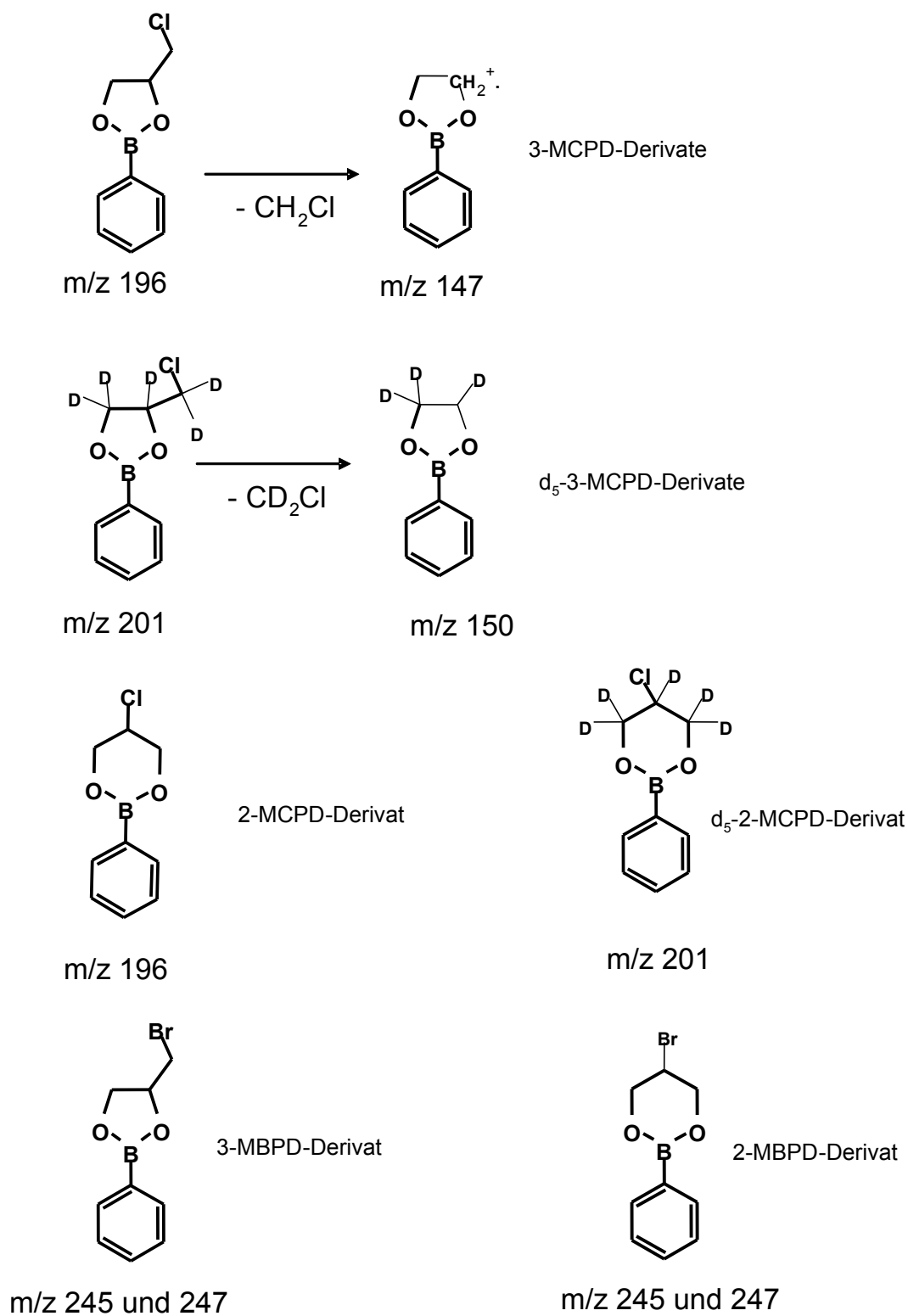


Abbildung 24 Ausgewählte Fragmentationen der GC-MS-SIM-Methoden für Human- und Säuglingsmilchnahrung

**GC-MS-Auswertung:**

Als Quantifizierungen für 3-MCPD wurden die Fragmentationen m/z 196 bzw. 147 und für den internen Standard d<sub>5</sub>-3-MCPD die Fragmentationen m/z 201 bzw. 150 verwendet. Für das Isomer 2-MCPD wurde die Fragmentation m/z 196 und für den internen Standard d<sub>5</sub>-2-MCPD die Fragmentation m/z 201 verwendet. Als Quantifizierungen für 3-MBPD wurden die Fragmentationen m/z 240 bzw. 242 und für den internen Standard d<sub>5</sub>-3-MBPD die Fragmentationen m/z 245 bzw. 247 verwendet. Die potentielle (ungewünschte) Entstehung von 2-MBPD aus Glycidol wurde durch Auswertung der Fragmentationen m/z 240 bzw. 242 und von d<sub>5</sub>-2-MBPD (aus d<sub>5</sub>-Glycidol) die Fragmentationen m/z 242 bzw. 247 verwendet. Durchführung der Auswertung siehe oben.



## 6.8 Validierung und Qualitätssicherung

Mit der Validierung der Analysemethoden soll der Nachweis erbracht werden, dass das Prüfverfahren geeignet ist, die vorgegebene spezifische Prüfaufgabe zu erfüllen. Parameter der Methodenvvalidierung sind Richtigkeit, Präzision, Linearität, Selektivität, Wiederfindung, Nachweis- und Bestimmungsgrenze und Robustheit (Kromidas 2011). Je nach Methode und Aufgabenstellung sind verschiedene Validierungsparameter von unterschiedlicher Bedeutung.

Die **Richtigkeit** trifft eine Aussage über systematische Fehler des Prüfverfahrens. Sie ist das Maß der Übereinstimmung zwischen dem ermittelten Wert und einem als richtig angesehenen Wert (Kromidas 2011). Da der wahre Wert prinzipiell nicht bekannt sein kann, bezieht man sich auf einen Wert, der als fehlerfrei gilt wie z.B. auf ein zertifiziertes Referenzmaterial. Für die Analytik der MCPD-Fettsäureester und GE existiert bislang kein zertifiziertes Referenzmaterial, jedoch sind sehr gut charakterisierte Ringversuchsproben vorhanden, die von verschiedenen Laboren mit unterschiedlichen Methoden untersucht wurden. Bei den vorliegenden Untersuchungen von Humanmilch, Ziegenmilch und Säuglingsmilchnahrung wurde deshalb in jeder Serie eine Ringversuchprobe (Säuglingsmilchnahrung) mit aufgearbeitet und analysiert.

Unter **Präzision** wird das Maß für die Streuung von Analysenergebnissen aufgrund zufälliger Fehler verstanden. Sie wird als Standardabweichung von mehreren Einzelmessungen angegeben. Die relative Standardabweichung ist identisch mit dem Variationskoeffizienten ( $V_k$ ). Bei Analysen unter Wiederholbedingungen sollte der laborinterne Variationskoeffizient typischerweise zwischen der Hälfte und zwei Dritteln der Reproduzierbarkeits  $V_k$ s liegen. Im Zuge dieser Untersuchungen wurden alle Proben mehrfach bestimmt (Dreifachbestimmung bei Milch, mindestens Doppelbestimmung bei Säuglingsnahrung) und der  $V_k$  ermittelt. War dieser größer als 5 %, wurde die Messung wiederholt.

Die **Wiederfindung** ist das Verhältnis des unter Wiederholbedingungen erhaltenen Mittelwertes zum tatsächlichen Gehalt einer Komponente in der Probe. Sie macht Aussagen über Verluste durch Probenvorbereitungsschritte oder Matrixeinfluss (Kromidas 2011). Ermittelt wird die Wiederfindungsrate i.d.R. durch Dotierung einer Blankprobe (analytfreie Probe mit Matrix) mit dem Analyten. Die akzeptierte Wiederfindungsrate hängt von der Konzentration des Analyten in der Probe ab. In der Entscheidung 2002/657 EC sind Kriterien für die Wiederfindungsraten einer Methode im Zusammenhang mit dem Parameter Richtigkeit (Abschnitt 2.3.2.1 2002/657/EG) vorgegeben. In Abhängigkeit von der Analyt-Konzentration sind für Mengen > 10 µg/kg Wiederfindungsraten von 80 % - 110 % akzeptabel.

Unter **Linearität** wird in der instrumentellen Analytik die Fähigkeit einer Methode verstanden, innerhalb eines gegebenen Konzentrationsbereiches Ergebnisse zu liefern, die der Konzentration des Analyten direkt proportional ist (Kromidas 2011). Sie ist damit ein Maß für den mathematischen Zusammenhang des Messsignals und der Konzentration des Analyten.

**Selektivität** ist die Fähigkeit eines Analysenverfahrens, den zu bestimmenden Stoff von anderen in der Probe zu unterscheiden. Die **Spezifität** ist die Fähigkeit einer Methode, eine Substanz ohne Verfälschung durch andere, in der Probe vorhandene Komponenten zu erfassen und sie somit eindeutig zu identifizieren (Kromidas 2011).

Die **Nachweisgrenze** ist die kleinste nachweisbare Menge. Mit der **Erfassungsgrenze** ist die Mindestmenge gemeint, die mit vorgegebener Wahrscheinlichkeit nachgewiesen wird. Die **Bestimmungsgrenze** ist die kleinste quantifizierbare Menge.

### 6.8.1 Validierung der Methode zur Untersuchung von Säuglingsmilch (Methode B)

Zur **Qualitätskontrolle** bzw. Ermittlung der **Richtigkeit** der Methode wurde eine Probe Säuglingsmilchnahrung, die im Ringversuch von mehreren Laboren mit unterschiedlichen Methoden gemessen wurde (Fry *et al.*, 2013), in jeder Serie mitgeführt. In Abbildung 25 ist zu sehen, dass die Ergebnisse für gebundenes 2- und 3-MCPD mit den Ergebnissen des Ringversuchs vergleichbar sind (der Gehalt an gebundenem Glycidol wurde im Ringversuch nicht bestimmt). Innerhalb der Serien der vorliegenden Arbeit sind die Werte ebenfalls vergleichbar. Damit wurden die Messwerte unter identischen Bedingungen gewonnen.

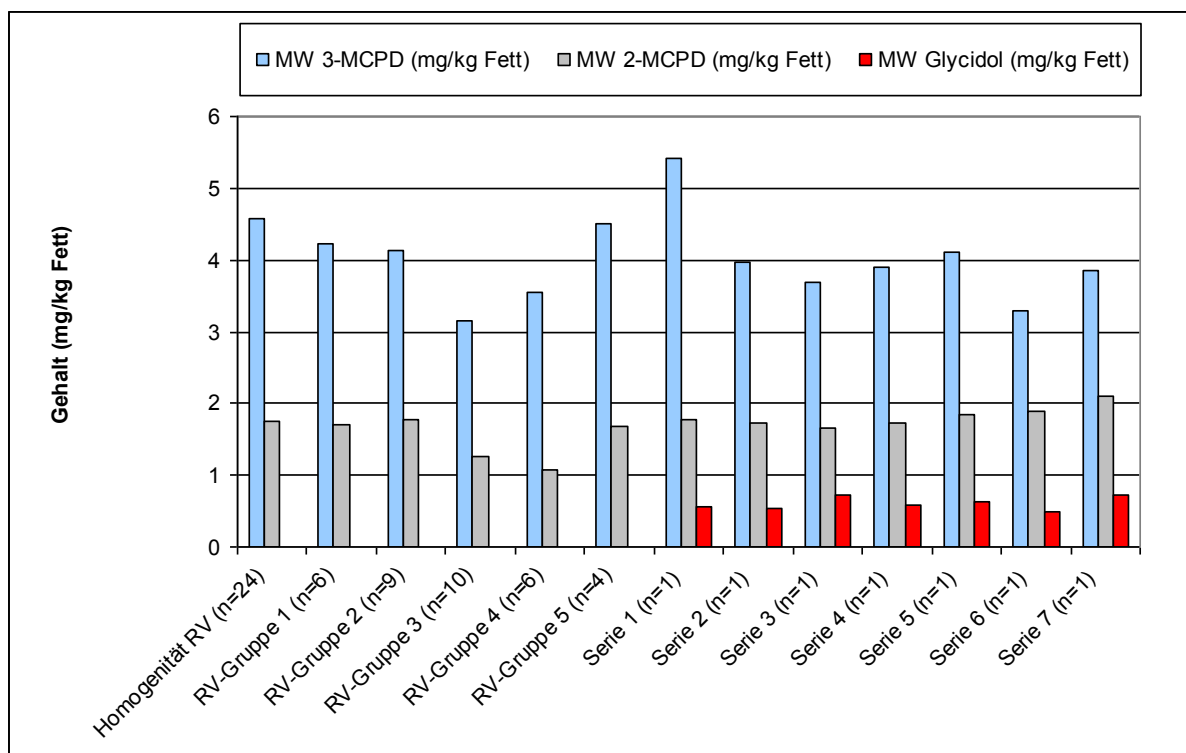


Abbildung 25 Ergebnisse der Qualitätskontrollprobe über den Analysenzeitraum mit Methode B. Vergleich mit Ergebnissen eines Ringversuchs (RV). Die Ergebnisse des RV wurden abhängig von der angewendeten Analysenmethode gruppiert.

### Präzision und Wiederfindungsraten (WFR in %)

Als Maß für die **Präzision** wurden die intraday Variationskoeffizienten berechnet. Die Berechnung erfolgte aus dem Schätzwert der Standardabweichung der Mehrfachbestimmung eines Tages und dem dazugehörigen Mittelwert.

$$s_c = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (c_i - \bar{c})^2}{n-1}}$$

$$\text{Var}_{\text{koeff}} = \frac{s_c}{\bar{c}} \cdot 100\%$$

Tabelle 20 Präzision der Methode B – Variationskoeffizienten innerhalb eines Tages

	2-MCPD	3-MCPD	Glycidol
Mittelwert Probe 1 (mg/kg) n=5	0,240	0,526	1,029
intraday VK (%)	5,64	2,98	5,04
Reproduzierbarkeits-CV berechnet mit der Horwitz-Gleichung	20	18	16
Mittelwert Probe 2 (mg/kg) n=5	0,558	1,099	0,243
intraday VK (%)	3,53	2,04	4,16
Reproduzierbarkeits-CV berechnet mit der Horwitz-Gleichung	17	16	20

Für die Bestimmung der **Wiederfindung** im mittleren bzw. hohen Kalibrierbereich wurden zwei Gramm Milchpulver derselben Probe sechsmal mit 1,68 µg freiem MCPD (2,52 µg Glycidol) bzw. sechsmal mit 3,0 µg freiem MCPD (4,5 µg Glycidol) dotiert. Das entspricht 3 mg/kg freiem MCPD (4,5 mg/kg Glycidol) bzw. 5,5 mg/kg freiem MCPD (8,2 mg/kg Glycidol).

Berechnung:

$$\text{WFR}(\%) = \frac{\text{Analysenergebnis } (\mu\text{g/g}) * \text{Fettausbeute (g)} - \text{Grundbelastung Probe (g)}}{\text{Dotierung (freies MCPD } (\mu\text{g abs.)})}$$

Die Grundbelastung der Probe wurde mit den Werten aus Tabelle 24 ermittelt. Die Ermittlung der Fettausbeute ist in Abschnitt 3.7.1 beschrieben. Da die Fettausbeute sich teilweise zwischen den Einzelproben unterscheidet, wurde zunächst für jede Probe die Wiederfindungsrate einzeln ermittelt und daraus der Mittelwert gebildet. Die Wiederfindungsraten zeigt Tabelle 21.

Tabelle 21 Wiederfindungsraten bei Dotierung von Säuglingsanfangsnahrung im mittleren bzw. hohen Kalibrierbereich

	<b>2-MCPD</b>	<b>3-MCPD</b>	<b>Glycidol</b>
Dotierung in µg abs.	1,68	1,68	2,52
Dotierung in mg/kg Milchfett*	3,00	3,00	4,50
<b>Mittelwert Wiederfindung (n=6)</b>	<b>78,0%</b>	<b>91,3%</b>	<b>85,1%</b>
Dotierung in µg abs.	3,00	3,00	4,50
Dotierung in mg/kg Milchfett*	5,50	5,50	8,20
<b>Mittelwert Wiederfindung (n=6)</b>	<b>77,9%</b>	<b>93,7%</b>	<b>84,6%</b>

\*Durchschnittswerte, da abh. von ermitteltem Fettgehalt.

Die ermittelten Wiederfindungsraten liegen mit Ausnahme von gebundenem 2-MCPD im angestrebten Bereich von 80 % - 110 %. Mit 78 % liegen die Wiederfindungsraten für 2-MCPD jedoch nur leicht unter diesem Bereich.

Der **lineare Arbeitsbereich** wurde anhand einer Kalibrierung im Bereich von 0 bis 0,6 µg absolut für MCPD bzw. im Bereich von 0 bis 0,9 µg für Glycidol untersucht. Dies entspricht einem Bereich von 0 bis 6 mg/kg Milchfett für gebundenes MCPD und 0 bis 9 mg/kg für gebundenes Glycidol. Zur Erstellung der Kalibrierfunktionen 1. und 2. Ordnung wurden die Flächenverhältnisse der Analyten und dem jeweiligen internen Standard über die Konzentration des Analyten aufgetragen.

Tabelle 22 Lineare und quadratische Kalibrierfunktionen für Säuglingsmilch

	Funktion 1. Ordnung	Funktion 2. Ordnung
	$y = a * c_{Analyt} + b$	$y = a_1 * c_{Analyt}^2 + a_2 * c_{Analyt} + b$
2-MCPD-Ester	$y = 18,945 * c - 0,003$	$y = -2,934 * c^2 + 20,615 * c - 0,109$
3-MCPD-Ester	$y = 4,292 * c - 0,0002$	$y = 0,084 * c^2 + 4,244 * c + 0,003$
Glycidyl-Ester	$y = 10,190 * c - 0,043$	$y = 0,371 * c^2 + 9,873 * c - 0,012$

y Peakfläche bzw. Peakflächenverhältnis

a Steigung der Regressionsgeraden 1. Grades

a<sub>1</sub> Steigung des 1. Terms der Regressionsgeraden 2. Grades

a<sub>2</sub> Steigung des 2. Terms der Regressionsgeraden 2. Grades

b Achsenabschnitt der Regressionsgeraden

c<sub>Analyt</sub> µg/kg Analyt in der Einwaage

Die Berechnung der Reststandardabweichung der Kalibrierfunktionen erfolgte nach folgenden Formeln

Funktion 1. Ordnung

$$S_{y1} = \sqrt{\frac{\sum (c_{Mad} - \hat{c}_{Analyt})^2}{n - 2}}$$

Funktion 2. Ordnung

$$S_{y2} = \sqrt{\frac{\sum (c_{Analyt} - \hat{c}_{Analyt})^2}{n - 3}}$$

S<sub>y1</sub>

Reststandardabweichung der Funktion 1. Grades

S<sub>y2</sub>

Reststandardabweichung der Funktion 2. Grades

n

Anzahl der Messungen

Der Vergleich der Reststandardabweichung der linearen und der quadratischen Kalibrierfunktion führt zu einer qualitativen Aussage über die Linearität des Arbeitsbereiches. Ist die Reststandardabweichung der Funktion 1. Grades kleiner oder gleich der Reststandardabweichung der Funktion 2. Grades, so ist die Kalibrierfunktion im untersuchten Arbeitsbereich als linear anzusehen. Die Reststandardabweichungen der Kalibrierfunktionen 1. und 2. Ordnung lagen für alle Analyten in der gleichen Größenordnung (Tabelle 22), so dass keine eindeutige Entscheidung über die Linearität des Arbeitsbereiches getroffen werden konnte.

te. Aus diesem Grund wurde die Linearität zusätzlich anhand des Anpassungstests nach Mandel untersucht.

Tabelle 23 Linearität des Arbeitsbereiches (Reststandardabweichung der Kalibrierfunktion 1. und 2. Ordnung, Mandel-Anpassungstest) der Methode B

Analyt	Reststandardabweichung der Kalibrierfunktion		Prüfgröße F (Mandel-Anpassungstest)
	1. Ordnung	2. Ordnung	(kritischer F-Wert = 13,75)
2-MCPD-	0,2600	0,2336	2,60
3-MCPD-	0,0181	0,0176	1,41
Glycidyl-	0,0846	0,0743	3,09

Beim Mandel-Anpassungstest wird mit Hilfe eines F-Tests geprüft, ob die Abweichung der Kalibrierpunkte von der Regressionsgeraden (Funktion 1. Ordnung) signifikant größer ist als die von der Kalibrierfunktion 2. Ordnung. Anhand dieses Tests ergab sich, dass für alle Kalibrierreihen die lineare Funktion bzw. die Funktion 1. Ordnung zur Quantifizierung angewendet werden kann, da die berechneten Prüfgrößen kleiner als der kritische F-Wert von 13,75 waren.

**Die Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen** wurden rechnerisch nach DIN 32 645 ermittelt. Aufgrund der Abwesenheit einer Blankmatrix wurde das Leerwertverfahren angewendet (Modifikation der direkten Methode).

Hierfür wurde die Standardabweichung des Leerwertes bestimmt. Der Leerwert unterscheidet sich vom Blindwert durch die Anwesenheit der Probenmatrix. Daraus wird über das einseitige Prognoseintervall ein Mindestgehalt, der sich eben noch signifikant vom Leerwert unterscheiden lässt, ermittelt. Dies ist die Nachweisgrenze  $x_{NG}$ . Als Randbedingungen für normgerechte Ergebnisse wurden festgelegt: 10 Parallelbestimmungen des Leerwertes, ein Vertrauensintervall von 99% (einseitige Fragestellung) sowie Einfachbestimmung bei der Analyse der Leerwerte.

Die Ermittlung der Leerwertstreuung bietet häufig experimentelle Probleme, etwa wenn die Auflösung des Messgerätes unzureichend ist (führt zu exakt übereinstimmenden Resultaten mit  $s = 0$ ), oder wenn eine Standardabweichung aus dem Rauschen einer Basislinie berechnet werden soll.

Eine Lösung dieser Probleme bietet eine Modifikation des Leerwertverfahrens. An Stelle der Direktbestimmung der Leerwertstreuung ermittelt man die Ergebnisstreuung einer Analysenprobe, deren Gehalt in der Nähe der Nachweisgrenze liegt (Huber 2001). Genauso wie beim Leerwertverfahren von der Streuung des Leerwertes auf die Streuung der Gehalte geschlossen wird, kann auch umgekehrt von der Streuung des Gehaltes einer entsprechenden Probe auf die Streuung des Leerwertes geschlossen werden.

Die Gleichung zur Berechnung der **Nachweisgrenze**  $x_{NG}$  lautet:

$$x_{NG} = s_x \cdot t_{\alpha;f} \cdot \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n}}$$

mit

$s_x$  : Standardabweichung der Gehalte der Probe

$t$  : Quantil der t-Verteilung

$\alpha$  : Signifikanzniveau (Wahrscheinlichkeit für den Fehler 1. Art), nach Norm = 0,01

$f$  : Anzahl der Freiheitsgrade =  $n-1$

$m$  : Anzahl der Messungen der Analysenprobe, nach Norm = 1

$n$  : Anzahl der Kalibrierdaten, nach Norm = 10

Es ergibt sich mit  $t_{0,01;9} = 2,821$  (Tabellenwert):

$$x_{NG} = s_x \cdot 2,821 \cdot \sqrt{1 + \frac{1}{10}} = s_x \cdot 2,96$$

Über die Nachweisgrenze lässt sich die **Erfassungsgrenze**  $x_{EG}$  nach DIN 32 645 durch Multiplikation mit 2 berechnen:  $x_{EG} = 2 \cdot x_{NG}$

Die Erfassungsgrenze ist der kleinste Gehalt einer gegebenen Probe, bei dem unter mit einer Wahrscheinlichkeit von 99 % (Normbedingung) ein Nachweis möglich ist.

Die **Bestimmungsgrenze**  $x_{BG}$  (Mindestgehalt einer Probe, ab der eine quantitative Angabe zulässig ist) kann ohne Kenntnis der Streuungsdaten der Kalibriergeraden nicht exakt berechnet, sondern nur abgeschätzt werden. Da für Normbedingungen nach DIN 32 645 die Bestimmungsgrenze derjenige Gehalt sein soll, bei dem das halbe Prognoseintervall des Wertes gerade 33 % beträgt, lässt sich die Bestimmungsgrenze mit  $x_{BG} \approx 3 \cdot x_{NG}$  abschätzen.

Die niedrig belastete Probe wurde 10 x exemplarisch nach Methodenvorschrift aufgearbeitet und mittels GC-MS vermessen. Messung und Aufarbeitung der Probe fanden zeitgleich mit der Bestimmung der Wiederfindung statt und dienten zusätzlich der Ermittlung der Grundbelastung der Probe. Tabelle 24 zeigt Nachweis-, Bestimmungs- und Erfassungsgrenze für alle drei Analyten in mg/kg MilCHFett. Zusätzlich wurden die Grenzen mit Hilfe des durchschnittlichen Fettgehalts in µg/kg Milchpulver berechnet.

Tabelle 24 Übersicht über NG, EG und BG in Milchfett und in Milchpulver, ermittelt nach der Leerwertmethode nach DIN 32 645 in Methode B

	Gehalt (mg/kg Fett)			
Messung	2-MCPD	3-MCPD	Glycidol	Fettgehalt
1	0,155	0,475	0,197	25,4%
2.	0,172	0,432	0,210	26,6%
3.	0,148	0,456	0,188	26,8%
4	0,190	0,491	0,229	27,1%
5.	0,171	0,465	0,195	27,2%
6.	0,156	0,447	0,190	26,8%
7.	0,154	0,459	0,206	26,7%
8.	0,141	0,415	0,188	27,1%
9.	0,151	0,460	0,232	27,7%
10.	0,153	0,447	0,219	28,0%
MW [mg/kg]	0,159	0,455	0,205	<b>26,9%</b>
STABW [mg/kg]	0,014	0,021	0,017	0,0071
<b>X<sub>NG</sub> in mg/kg Milchfett</b>	<b>0,042</b>	<b>0,063</b>	<b>0,049</b>	
<b>X<sub>EG</sub> in mg/kg Milchfett</b>	<b>0,084</b>	<b>0,126</b>	<b>0,099</b>	
<b>X<sub>BG</sub> in mg/kg Milchfett</b>	<b>0,126</b>	<b>0,190</b>	<b>0,148</b>	
	Gehalt (µg/kg Milchpulver)			
<b>X<sub>NG</sub> in mg/kg Milchpulver</b>	<b>0,011</b>	<b>0,017</b>	<b>0,013</b>	
<b>X<sub>EG</sub> in mg/kg Milchpulver</b>	<b>0,023</b>	<b>0,034</b>	<b>0,027</b>	
<b>X<sub>BG</sub> in mg/kg Milchpulver</b>	<b>0,034</b>	<b>0,051</b>	<b>0,040</b>	

### 6.8.2 Validierung der Methode zur Untersuchung von Humanmilch

Zur Qualitätskontrolle und Ermittlung der Richtigkeit der Analyse wurde in jeder Probenreihe die in Abschnitt 6.8.1 beschriebene Qualitätskontrollprobe mitgeführt. Die Probe wurde entsprechend den Herstellerhinweisen mit Wasser zubereitet und analog den Humanmilchproben extrahiert und analysiert. Die Ergebnisse in jeder Serie waren mit denen aus dem Ringversuch von 2011 vergleichbar (Abbildung 26) als auch mit den Ergebnissen der Untersuchung der Säuglingsmilchnahrung (Abbildung 25).



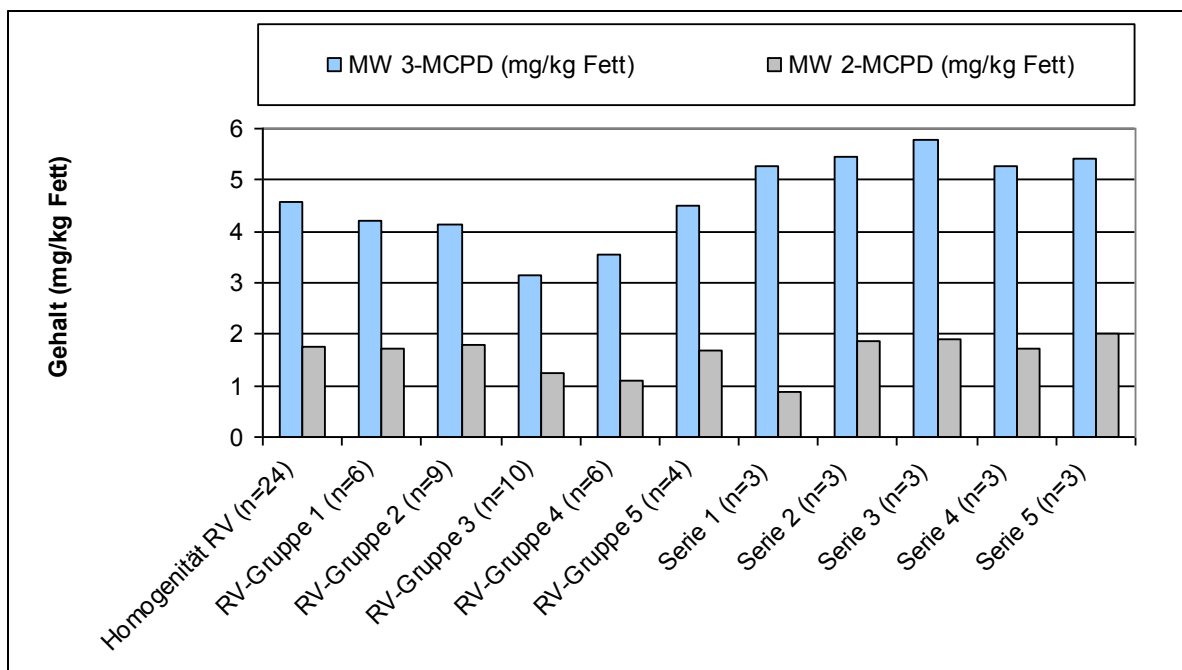


Abbildung 26 Ergebnisse der Qualitätskontrollprobe über den Analysenzeitraum mit Methode A. Vergleich mit Ergebnissen eines Ringversuchs (RV). Die Ergebnisse des RV wurden abhängig von der angewendeten Analysenmethode gruppiert.

**Präzision und Wiederfindungsraten** der Methode wurden anhand dotierter Blankmatrixes (Kuhmilch) in 3 Konzentrationsstufen (5-fach-Aufarbeitung) ermittelt.

Tabelle 25 Ermittlung von Präzision und Wiederfindung in Milch (Methode A)

n	Konzentration Spike in (mg/kg Fett)	3-MCPD eingesetzt als 1,2-Bis-palmitol-3-chloropropanediol		2-MCPD eingesetzt als Distearoyl-2-chloropropanediol	
		Relative Standard-abweichung (%)	Wiederfindung (%)	Relative Standard-abweichung (%)	Wiederfindung (%)
5	0,2	3,92	92,3	1,98	115,9
5	1,5	1,83	101,5	1,30	95,9
5	3,0	2,50	99,6	2,81	95,7

Die ermittelten Wiederfindungsraten liegen mit Ausnahme von gebundenem 2-MCPD bei der niedrigsten Konzentration im angestrebten Bereich von 80 % - 110 %.

Der **lineare Arbeitsbereich** wurde anhand einer Matrixkalibriergeraden mit Kuhmilch im Bereich von 0 bis 0,6 µg absolut für 2- und 3-MCPD-Ester untersucht. Das entspricht bei einer Einwaage von 100 mg MilCHFett 0 bis 6 mg/kg Fett. Zur Erstellung der Kalibrierfunktionen 1.

und 2. Ordnung wurden die Flächenverhältnisse der Analyten und dem jeweiligen internen Standard über die Konzentration des Analyten aufgetragen (Das Verfahren ist in Abschnitt 6.8.1 beschrieben).

Tabelle 26 Lineare und quadratische Kalibrierfunktionen für Milch (Methode A)

	Funktion 1. Ordnung	Funktion 2. Ordnung
	$y = a * c_{Analyt} + b$	$y = a_1 * c_{Analyt}^2 + a_2 * c_{Analyt} + b$
2-MCPD-Ester	$y = 3,049 * c + 0,003$	$y = 0,567 * c^2 + 2,709 * c + 0,031$
3-MCPD-Ester	$y = 3,174 * c + 0,007$	$y = -0,466 * c^2 + 3,454 * c - 0,016$

Die Reststandardabweichungen der Kalibrierfunktionen 1. und 2. Ordnung lagen für beide Analyten in der gleichen Größenordnung (Tabelle 26), so dass keine eindeutige Entscheidung über die Linearität des Arbeitsbereiches getroffen werden konnte. Aus diesem Grund wurde die Linearität zusätzlich anhand des Anpassungstests nach Mandel untersucht.

Anhand dieses Tests ergab sich, dass für beide Kalibrierreihen die lineare Funktion bzw. die Funktion 1. Ordnung zur Quantifizierung angewendet werden kann, da die berechneten Prüfgrößen kleiner als der kritische F-Wert waren (Tabelle 27).

Tabelle 27 Linearität des Arbeitsbereiches (Reststandardabweichung der Kalibrierfunktion 1. und 2. Ordnung, Mandel-Anpassungstest) für Milch (Methode A)

Analyt	Reststandardabweichung der Kalibrierfunktion		Prüfgröße F (Mandel-Anpassungstest)
	1. Ordnung	2. Ordnung	(kritischer F-Wert = 16,26)
2-MCPD-Ester	0,0380	0,0294	5,02
3-MCPD-Ester	0,0249	0,0189	5,46

Da für diese Methode eine Blankmatrix zur Verfügung stand, wurden die **Nachweis- und Bestimmungsgrenzen** rechnerisch nach DIN 32645 ermittelt. Von einer Matrixkalibrierfunktion mit Kuhmilch wurde die Nachweisgrenze mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1 % und die Bestimmungsgrenze mit einer Ergebnisunsicherheit von 20 % nach DIN 32645-1994 berechnet.

Die Kenndaten der linearen Funktionen sowie die ermittelten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen sind in Tabelle 28 aufgeführt.

Tabelle 28 Kenndaten sowie Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Matrixkalibrierfunktionen nach DIN ISO 32645 für Methode A

	<b>3-MCPD (eingesetzt als 1,2-Bis-palmitol-3-chloropropanediol)</b>	<b>2-MCPD (eingesetzt als Distearoyl-2-chloropropanediol)</b>
<b>Nachweisgrenze</b>		
in Milchfett	63 µg/kg	27 µg/kg
in Milch	2,83 µg/kg	1,21 µg/kg
<b>Bestimmungsgrenze</b>		
in Milchfett	115 µg/kg	51 µg/kg
in Milch	5,17 µg/kg	2,29 µg/kg
<b>Bestimmtheitsmaß der Kalibriergeraden</b>	0,9881	0,9979

### 6.8.3 Validierung der Methode zur direkten Bestimmung von Glycidylestern

Die LC-APCI-MS-Methode wurde hinsichtlich Präzision (Reproduzierbarkeit und Wiederholpräzision) im Rahmen einer Methodenvvalidierungsstudie getestet. An der Studie nahmen 17 Labore, darunter auch das BfR, teil. Untersuchungsmaterial waren 18 Proben Speiseöl bzw. Pamfett (9 Blindduplikate) (Blumhorst *et al.*, 2012).

**Nachweis- und Bestimmungsgrenzen** wurden im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit über das Signal zu Rausch (s/n) Verhältnis abgeschätzt. 20 µl eines Standards der Konzentration 0,5 ng/ml wurden siebenmal injiziert und der Mittelwert aus den erhaltenen s/n Verhältnissen gebildet. Die Nachweisgrenze wurde als s/n=3, die Bestimmungsgrenze als s/n=10 festgelegt.

Tabelle 29 Abschätzung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen bei der direkten Bestimmung von 7 Glycidylfettsäureestern über das Signal zu Rausch Verhältnis nach Standardinjektion (Methode C)

Analyt	NG (ng/ml) s/n = 3	BG (ng/ml) s/n = 10	NG bei 10 mg Probe (mg/kg)	BG bei 10 mg Probe (mg/kg)
Glycidyl-Palmitat	0,133	0,443	0,013	0,044
Glycidyl-Stearat	1,121	3,737	0,112	0,374
Glycidyl-Oleat	0,025	0,082	0,003	0,008
Glycidyl-Linoleat	0,013	0,042	0,001	0,004
Glycidyl-Laurat	0,131	0,436	0,013	0,044
Glycidyl-Myristat	0,107	0,356	0,011	0,036
Glycidyl-Linolenat	0,134	0,448	0,013	0,045

Die ermittelten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen sind mit denen vergleichbar, die von AOCS für diese Methode ermittelt wurden (AOCS, 2012). Eine Ausnahme stellt Glycidyl-Stearat dar, da von den Autoren für diesen Analyten eine deutlich niedrigere NG von 0,19 ng/ml bzw. eine BG von 0,63 ng/ml ermittelt wurde. Eine Ursache dafür konnte bisher nicht identifiziert werden

## Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei Frau Hildburg Fry und Frau Dr. Angelika Preiß-Weigert dafür, dass sie mir die Möglichkeit gaben, dieses spannende und aktuelle Thema in der Fachgruppe Kontaminanten im Bundesinstitut für Risikobewertung zu bearbeiten. Vielen Dank für die großzügige Unterstützung.

Ich danke herzlich Herrn Prof. Gerhard Jahreis für die Betreuung der Promotion von Seiten der Friedrich-Schiller-Universität Jena, der mit seiner freundlichen Art stets ansprechbar war.

Herzlichen Dank auch an Herrn PD Dr. Volker Böhm und Herrn Prof. Michael Petz für die Erstellung der beiden weiteren Gutachten.

Ich danke allen Müttern, die durch die Bereitstellung von Humanmilch dazu beitrugen, dass die Aussagekraft der Ergebnisse erhöht werden konnte. Vielen Dank an Kirsten Kovacz und Elke Beyer für die Hilfe bei der Probensammlung!

Meinen lieben Kolleginnen der Fachgruppe 82 danke ich für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung. Vielen Dank an Angelika Hiller, Eileen Mähnert, Kerstin Mietle, Melanie Kotulla, Christina Radach und Mandy Schwieters. Die vielen Tipps, der wertvolle Erfahrungsaustausch sowie die Hilfsbereitschaft im Labor haben einen großen Anteil am Erfolg dieser Arbeit.

In sehr guter Erinnerung werde ich auch meine beiden ehemaligen Kollegen Andy Barheine und Christoph Gottschalk behalten.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Dorina Bodi und Dr. Anja These für die wertvollen Diskussionen, den nötigen Beistand, das Lesen des Manuskripts und die konstruktive Kritik.

Meiner Tochter Jella danke ich dafür, dass sie es großzügig toleriert hat, dass ich sehr viel Zeit mit und bei der Arbeit verbracht habe.

Mein besonderer Dank gilt meinem Mann für seine hilfreiche Unterstützung.

Berlin, im November 2013